



⑪ Veröffentlichungsnummer: **0 431 327 A1**

⑫ **EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG**

⑳ Anmeldenummer: 90121189.6

⑤① Int. Cl.⁵: **A61K 39/145, A61K 39/385**

㉔ Anmeldetag: 06.11.90

③① Priorität: 10.11.89 DE 3937412

③③ Veröffentlichungstag der Anmeldung:
12.06.91 Patentblatt 91/24

③④ Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE DK ES FR GB GR IT LI LU NL SE

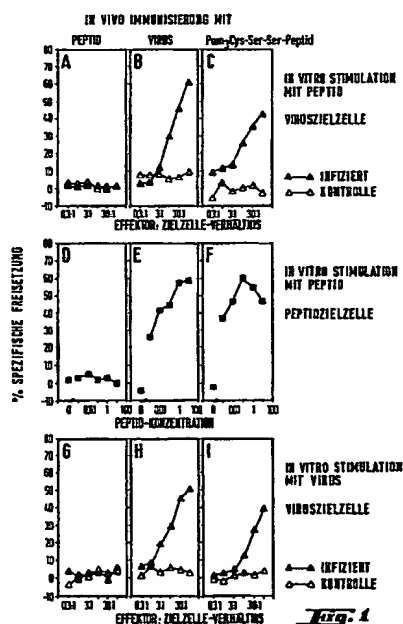
③⑦ Anmelder: **HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT**
Postfach 80 03 20
W-6230 Frankfurt am Main 80(DE)

③② Erfinder: **Jung, Günther**

Ob der Grafenhalde 5
W-7400 Tübingen(DE)
 Erfinder: **Rammensee, Hans-Georg**
Sommerhalde 3
W-7400 Tübingen(DE)
 Erfinder: **Deres, Karl**
Gartenstrasse 200
W-7400 Tübingen(DE)
 Erfinder: **Wiesmüller, Karl-Heinz**
Rappenberghalde 33
W-7400 Tübingen(DE)

⑤④ Synthetische Vakzine zur spezifischen Induktion zytotoxischer T-Lymphozyten.

⑤⑦ Eine synthetische Vakzine zur spezifischen Induktion von zytotoxischen T-Lymphozyten, besteht aus einem Konjugat aus mindestens einer Membranankerverbindung und einem mindestens ein Killer-T-Zellepitop enthaltenden Protein eines Virus, eines Bakteriums, eines Parasiten oder eines Tumorantigens oder mindestens einer mindestens ein Killer-T-Zellepitop enthaltenden Partialsequenz eines Virus-, Bakterium- oder Parasiten-Proteins oder eines Tumorantigens.



SYNTHETISCHE VAKZINE ZUR SPEZIFISCHEN INDUKTION ZYTOTOXISCHER T-LYMPHOZYTEN

Die vorliegende Erfindung betrifft eine synthetische Vakzine zur spezifischen Induktion zytotoxischer T-Lymphozyten.

5 Zytotoxische T-Lymphozyten (Killer-T-Zellen) stellen einen wesentlichen Teil der Immunantwort von Warmblütern gegen intrazelluläre Infektionen dar. Zytotoxische T-Lymphozyten werden normalerweise nur mittels einer in-vivo-Impfung mit infektiösen Erregern induziert (J. Bastin et al., J. Exp. Med., Vol 165, June 1987). Wegen der damit verbundenen Risiken würde ein synthetischer Impfstoff für die spezifische Induktion von zytotoxischen T-Lymphozyten eine erhebliche Verbesserung darstellen. Es wurde nun überraschenderweise gefunden, daß durch die Verwendung bestimmter Membranankerwirkstoffkonjugate enthaltend Killer-T-Zellepitope die spezifische in-vivo-Induktion von zytotoxischen T-Lymphozyten möglich ist.

10 Es ist zwar bereits bekannt, daß Membranankerwirkstoffkonjugate zur Erzeugung neutralisierender Antikörper geeignet sind (vgl. Angew. Chem. 97 (1985), Nr. 10, S. 883 ff.); über eine synthetische Vakzine enthaltend Membranankerwirkstoffkonjugate zur spezifischen Induktion von zytotoxischen T-Lymphozyten wurde jedoch bisher nicht berichtet.

15 Erfindungsgegenstand ist demzufolge eine synthetische Vakzine zur Induktion von zytotoxischen T-Lymphozyten, die dadurch gekennzeichnet ist, das sie aus einem Konjugat aus mindestens einer Membranankerverbindung und einem mindestens ein Killer-T-Zellepitop enthaltenden Protein eines Virus, eines Bakteriums, eines Parasiten oder eines Tumorantigens oder mindestens einer Partialsequenz enthaltend mindestens ein Killer-T-Zellepitop eines Virus-, Bakterium- oder Parasiten-Proteins oder eines Tumorantigens besteht.

20 Die genannte Membranankerverbindung ist vorzugsweise ein bakterielles Lipoprotein. Besonders bevorzugt ist als Membranankerverbindung eine Verbindung der nachstehenden Formeln

25

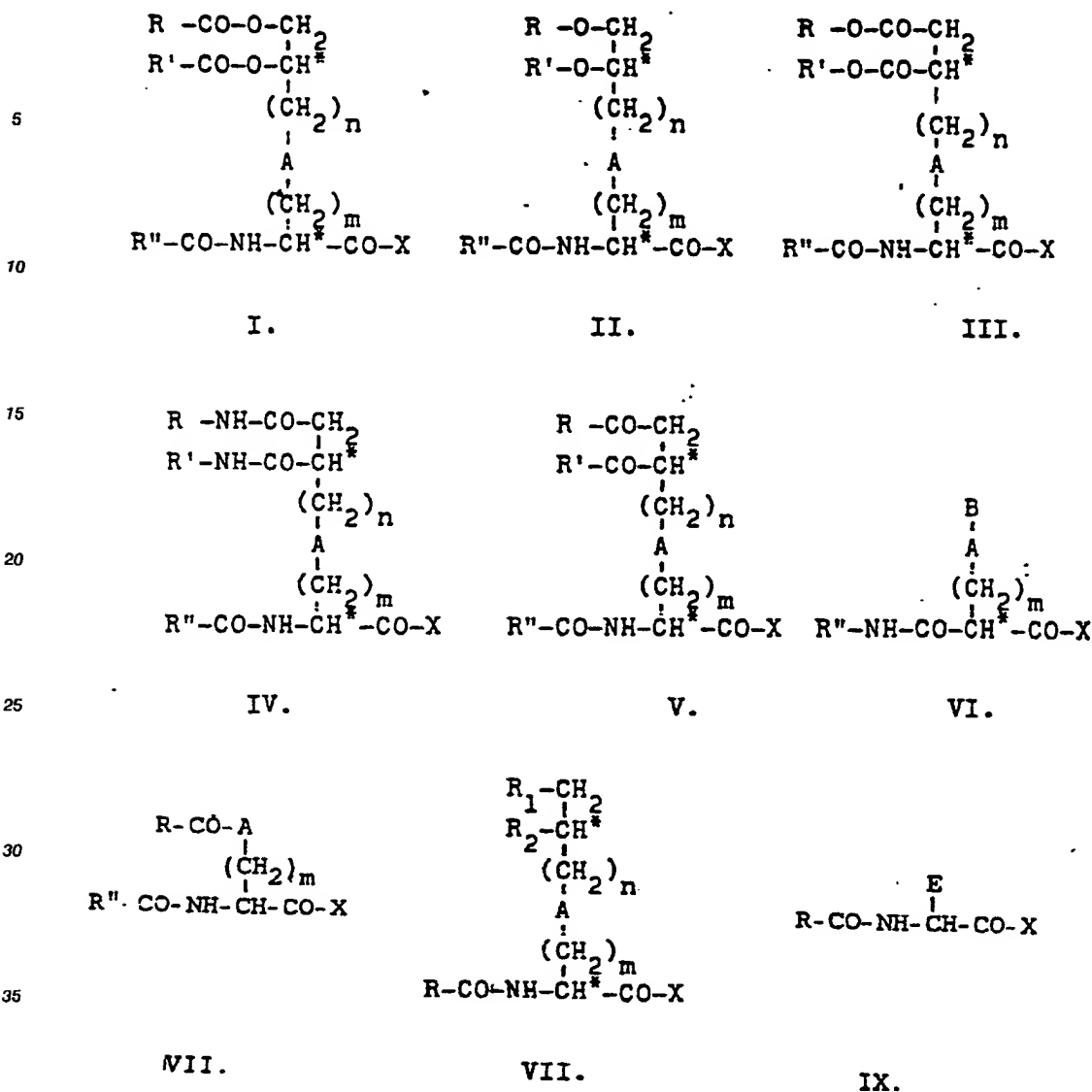
30

35

40

45

50



in denen A Schwefel, Sauerstoff, Disulfid (-S-S-), Methylen (-CH₂-) oder -NH- sein kann;

n = 0 bis 5, m = 1 oder 2;

C* ein asymmetrisches Kohlenstoffatom mit R- oder S-Konfiguration ist,

45 R, R' und R'' gleich oder verschieden sind und Wasserstoff oder eine Alkyl-, Alkenyl- oder Alkynylgruppe mit 7 bis 25 Kohlenstoffatomen sind, welche mit Hydroxy-, Amino-, Oxo-, Acyl-, Alkyl- oder Cycloalkylgruppen substituiert sein kann, E in Formel IX Wasserstoff oder eine beliebige Seitenkette einer natürlichen oder

50 artifiziellen α-Aminosäure sein kann, B in Formel VI die Bedeutung jedes der in den Formeln I - V aufgeführten -(CH₂)_n-(substituiertes Alkyl)-Reste haben kann und R₁ und R₂ gleich oder verschieden sind und dieselben Bedeutungen wie R, R' und R'' haben, aber auch -OR, -O-COR, -COOR, -NHCOR oder -CONHR sein können, wobei X eine Kette von bis zu 10 Aminosäuren ist, an die das Protein oder die Partialsequenz des Virus-, Bakterium- oder Parasiten-Proteins oder eines Tumorantigens gebunden ist, oder das Protein oder die Partialsequenz selbst ist.

Von diesen sind als Beispiele besonders hervorzuheben: In bakteriellem Lipoprotein vorkommende N-Termini, wie z.B.: Y-Ser-Ser-Ser-Asn, Y-Ile-Leu-Leu-Ala, Y-Ala-Asn-Asn-Gln, Y-Asn-Ser-Asn-Ser, Y-Gly-Ala-Met-Ser, Y-Gln-Ala-Asn-Tyr, Y-Gln-Val-Asn-Asn, Y-Asp-Asn-Ser-Ser, wobei Y einer der unter Formel I bis VII aufgeführten Reste sein kann. Diese Lipopentapeptide können auch in verkürzter Form (Lipodi-, Lipotri- oder Lipotetrapeptide) als Membranankerverbindung eingesetzt werden. Ganz besonders bevorzugt ist N-

Palmitoyl-S-[2,3(bispalmitoyloxy)propyl]-cysteiny-seryl-serin (Pam₃Cys-Ser-Ser), N-Palmitoyl-S-[2,3-(bispalmitoyloxy)propyl]-cysteiny-seryl-glycin und N-Palmitoyl-S-[2,3-(bispalmitoyloxy)propyl]-cysteiny-alanyl-D-isoglutamin.

Weiterhin besonders bevorzugt sind die Verbindungen der Formeln I und III, insbesondere Verbindungen der Formel I.

Der Substituent A ist vorzugsweise Schwefel oder Methylen, besonders bevorzugt Schwefel.

Die Substituenten R, R' und R'' sind vorzugsweise Alkylreste mit 14 bis 18 C-Atomen; besonders bevorzugt sind Alkylreste mit 16 C-Atomen.

Der Substituent X wird vorzugsweise gebildet aus 1 bis 2 polaren Aminosäureresten, besonders bevorzugt ist der Serin-Rest.

Für die erfindungsgemäße Vakzine eignen sich zur Kopplung an die Membranankerverbindung unterschiedliche Proteine oder Protein-Partialsequenzen von intrazellulär auftretenden Krankheitserregern, Viren-, Bakterien- oder Parasiten-Proteinen oder von Tumor-Antigenen, die von Killer-T-Zellen erkannt werden.

Solche Proteine oder Partialsequenzen (auch als Killer-T-Zell-Epitope bezeichnet) zeichnen sich dadurch aus, daß sie von zytotoxischen T-Lymphozyten zusammen mit MHC-Molekülen (major histocompatibility complex) erkannt werden.

Die erfindungsgemäße Vakzine eignet sich zur Immunisierung gegen alle Erreger, die Killer-T-Zell-Epitope aufweisen, wie z. B. gegen Adenoviren, HIV, Influenza-Viren, LCMV, MCMV, Hepatitis-Viren, HTLV, FELV, Treponema pallidum, Gonokokkus, Bordetella pertussis, Plasmodien, Listerien, Mycobakterien oder Leishmanien. Bisher bereits bekannte Killer-T-Zell-Epitope sind die in der nachfolgenden Tabelle aufgeführten Partialsequenzen, von denen das Influenza-Nukleoprotein P₃CSS-NP 147-158 (R⁻) und die HIV-Epitope eine Sonderstellung einnehmen.

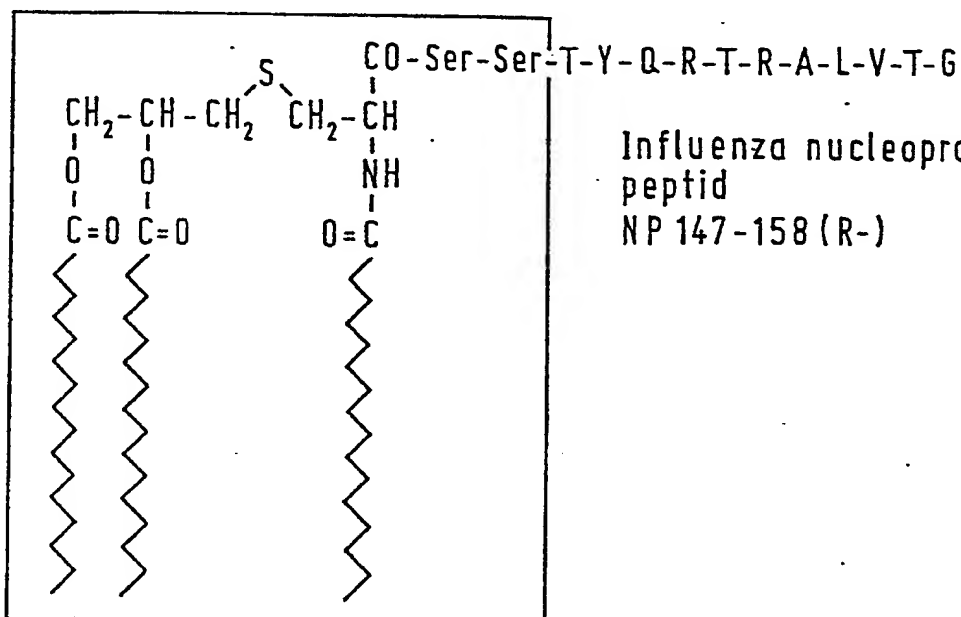
25

30

35

40

45



Influenza nucleoprotein
peptid
NP 147-158 (R⁻)

Lipotripeptid Pam₃Cys-Ser-Ser

50

55

	Organismus	Protein	von - bis	Restr.	Sequenz
	Adenovirus Ad5E1A			Db	PSNTPPEI
5	HIV	env (gp 120)	381-392	HLA A2	(K)NCGGEFFYCNS
	HIV	env (gp 120)	308-322	Dd	RIQRGRPGRAFTIGK
	HIV	env (gp 120)	410-429	DR4	GSDTITLPCRIKQFINMWQE
	HIV	gag (p17)	418-443	A2	KEGHQMKDCTERQANF
	HIV	gag (p17)	446-460	A2	GNFLQSRPEPTAPPA
10	HIV	gag (p24)	193-203	A2	GHQAAMEMLKE
	HIV	gag (p24)	219-233	A2	HAGPLAPGQMREPRG
	HIV	gag (p24)	265-280	B27	KRWIILGLNKIVRMYC
	Influenza	Nucleoprotein	82-94	HLA A2	MVVKLGEFYNQMM
	Influenza	Matrix	57-68	HLA A2	KGILGFVFTLTV
15	Influenza	Nucleoprotein	335-349	B37 B44 A2 Aw69	SAAFEDLRVLSFIRG
	Influenza	Hemagglutinin H3	58-73	H-2 Ad	ILDGIDCTLIDALLGD
	Influenza	Hemagglutinin H3	58-73	H-2 Ad	ILDGIDCTLIDALLGD
	Influenza	Hemagglutinin	181-204	H-2K;H-2K	-
20			103-123		
	Influenza	Nucleoprotein	365-379		SDYEGRLIQNSLTI
	Influenza	Nucleoprotein	335-349	H-2b	IASNENMETMESSTL
	Influenza	Nucleoprotein	384-393	HLA B27	RYWAI RTRSG
	Influenza	Nucleoprotein	147-158	Kd	TYQRTRALV (R) TG
25	A/NT/60/68	Nucleoprotein	118-126	Ld Lq	RPQASGVYM
	LCMV	-			
	LCMV	-	278-286	H-2b	VENPGGYCL
	-	-	277-293	H-2b	GVENPGGYCLTKWMILA
	-	-	168-176	-	YPHFMPNTL
30	MCMV	-	161-179	Ld	GRLMYDMYPHFMPNTLGPS
	P815	Tumor antigen P91A	12-24	Ld	ISTQNHRALDLVA
	Plasmodium falciparum, berghei	Circumsporozoite prot.	368-390	H-2K	KPKDEL DYENDIEKKICKMEKCSC
35		Circumsporozoite prot.	249-260	Kd	NDDSYIPSAEKI
	yoelii	-	276-288	Kd	NEDSYVPSAEQI
	Hepatitis B	HBsAg	21-28	-	PLGFFPDH

40

Mit Hilfe der erfindungsgemäßen Vakzine ist es darüber hinaus möglich, verschiedene Membrananker-
verbindungen, gekoppelt an verschiedene Partialsequenzen zu mischen, um eine auf ein bestimmtes Ziel
optimal abgestimmte Vakzine zu erhalten. Weiterhin kann eine entsprechende Mischung zusätzlich Mem-
branankerwirkstoffkonjugate enthalten, die die humorale Immunantwort stimulieren und zusätzlich zur
45 Produktion von neutralisierenden Antikörpern führen (Vaccine 7, 29 - 33 (1989), Angew. Chem., Int. Ed. 24,
872 - 873 (1989)). Darüber hinaus ist es auch möglich, verschiedene Partialsequenzen kovalent zu
verknüpfen und mit einer Membranankerverbindung zu verbinden.

50

Erfindungsgegenstand ist weiterhin ein Verfahren zur Herstellung einer synthetischen Vakzine, das
dadurch gekennzeichnet ist, daß Proteine oder Partialsequenzen von Erregern durch eine Konjugationsreak-
tion an die Membranankerverbindung gebunden wird. Die Konjugationsreaktion kann z. B. eine Kondensa-
tion, Addition, Substitution, Oxidation oder Disulfidbildung sein. Bevorzugte Konjugationsmethoden sind in
den Beispielen wiedergegeben. Weitere Konjugationsmethoden sind in der bereits zitierten Deutschen
Offenlegungsschrift 35 46 150 beschrieben.

55

Die Herstellung der Membranankerverbindungen ist ebenfalls in der zuletzt genannten deutschen
Offenlegungsschrift ausführlich beschrieben.

Die gegebenenfalls nötige Trennung der Diastereomeren kann nach unterschiedlichen Methoden, wie z.
B. in Hoppe-Seyler's Z. Physiolog. Chem. 364 (1983) 593 beschrieben erfolgen.

Der Aufbau der für die Membranankerwirkstoffkonjugate einzusetzenden Partialsequenzen kann auf

unterschiedliche, literaturbekannte Weise erfolgen, vgl. z. B. Wunsch et al. in Houben-Weyl, Bd. 15/1.2, Stuttgart, Thieme-Verlag oder Wunsch in Angew. Chem. 83 (1971), E. Gross und J. Meienhofer (Herausgeb.), The Peptides, Vol. 1 (1979), 2 (1979), 3 (1981) und 5 (1983) Academic Press, New York 7713 oder die Deutsche Offenlegungsschrift 35 46 150. In Beispiel 1 wird ein bevorzugtes Verfahren zur Herstellung einer Partialsequenz und eines Konjugats näher erläutert.

Weiterhin gehören zum Erfindungsgegenstand pharmazeutische oder veterinärmedizinische Zubereitungen, die einen Gehalt an Konjugat aus mindestens einer Membranankerverbindung und mindestens einer Partialsequenz eines der genannten Proteine oder Organismen aufweisen. Normalerweise werden zusätzlich neben einem Lösungsmittel keine zusätzlichen Hilfs- und Trägerstoffe oder Adjuvantien für die erfindungsgemäßen Zubereitungen benötigt. In manchen Fällen kann es aber sinnvoll sein, derartige Hilfs- und/oder Trägerstoffe sowie gegebenenfalls Adjuvantien den erfindungsgemäßen Zubereitungen zuzusetzen (Anton Mayr, Gerhard Eißnen, Barbara Mayr-Bibrack, Handbuch der Schutzimpfungen in der Tiermedizin, 1984, Verlag Paul Parey, Berlin-Hamburg).

Die Menge an Vakzine, die für eine sichere Immunisierung eines Warmblüters notwendig ist, hängt ab von der Art des Warmblüters, von der bzw. den Membranankerverbindungen und dem Protein oder der bzw. den Partialsequenzen des Organismus, gegen den immunisiert werden soll und ist im Einzelfall empirisch zu ermitteln.

Durch die nachfolgenden Beispiele soll die Erfindung näher erläutert werden.

20 Synthese

Beispiel 1

Synthese von N-Palmitoyl-S-[2,3-(bispalmitoyloxy)-propyl]cysteinyl-seryl-seryl-NP 147-158

Die Influenza A-Virus-Nukleoprotein-Peptidsequenz wurde durch Festphasenpeptidsynthese synthetisiert. Es wurden Fmoc-Aminosäuren benutzt. Folgende Seitenkettenschutzgruppen kamen zur Anwendung: Thr(tBu), Tyr(tBu), Arg(Pmc). Es wurde 1 g para-Benzoyloxybenzylalkohol-Harz, beladen mit 0,5 mmol Fmoc-Gly eingesetzt und die Peptidsequenz nach folgenden Syntheseyklen aufgebaut. N-Aktivierung mit 50 % Piperidin in DMF (1 x 10 min). Kupplung der folgenden Aminosäure für 30 min mit BOP/HOBT [Benzotriazol-1-yl-oxy-tris-(dimethyl amino)-phosphoniumhexafluorophosphat/1-Hydroxybenzo-triazol] und Diisopropylethylamin in DMF. Es wurden jeweils Doppelkupplungen mit 3-fachem Überschuß an Fmoc-Aminosäure und 4,5-fachem Überschuß an Diisopropylethylamin (jeweils bezogen auf freie Aminogruppen am Harz) durchgeführt. Nach jeder Doppelkupplung wurde das Peptidharz je dreimal mit N-Methylpyrrolidon, Dichlormethan und N-Methylpyrrolidon gewaschen.

Nach der Synthese der harzgebundenen Influenza A-Virus-Nukleoprotein-Sequenz wurde ein Teil des Peptids durch Trifluoressigsäurespaltung gewonnen und auf Reinheit geprüft mittels HPLC, MS, Aminosäureanalyse, Analyse auf chiraler Phase sowie Sequenzanalyse. Die HPLC-Prüfung ergab eine Reinheit von über 90 %. Nach Kupplung von zwei Serinresten [Fmoc-Ser(tBu)] an das harzgebundene Peptid, erfolgte die Kupplung des Tripalmitoyl-S-glycerincysteins nach der DIC/HOBT-Methode. Nach vier Stunden wurde ein Äquivalent N-Methylmorpholin hinzugefügt und nach einer weiteren Stunde wurde das Lipopeptid-Harz gewaschen. Das Lipopeptid wurde von 100 mg Harz mittels 2 ml Trifluoressigsäure (mit 100 µl Thioanisol und 100 µg Thiokresol) innerhalb von einer Stunde getrennt. Um die Arg(Pmc)-Schutzgruppen vollständig zu entfernen, wurde zusätzlich 30 min bei 50 °C mit Trifluoressigsäure nachbehandelt. Das Filtrat wurde eingedampft, der Rückstand mit Essigsäure aufgenommen und in kalten Ether gegeben. Das ausgefallene Lipopeptid wurde 3 x mit Ether gewaschen und aus tert.-Butanol/Wasser im Verhältnis 3 : 1 lyophilisiert.

Beispiel 2

Synthese von N-Palmitoyl-S-[2,3-(bispalmitoyloxy)-propyl]cysteinyl-seryl-seryl-NP (365-380)

Die Synthese erfolgte analog Beispiel 1. Es wurden Fmoc-Aminosäuren mit folgenden Seitenkettenschutzgruppen benutzt: Ser(tBu), Glu(OtBu), Thr(tBu). Asn wurde ohne Seitenkettenschutzgruppe mittels Diisopropylcarbodiimid/HOBT gekuppelt. Als Ausgangsharz wurde Fmoc-Glu(OtBu)-p-Benzoyloxybenzylalkohol-Polystyrol, quervernetzt mit 1 % Divinylbenzol, eingesetzt. Die Beladung an Fmoc-Glu(OtBu) betrug 0,45 mmol/g. Die Abspaltung des Peptids und Pam₃Cys-Ser-Ser-Peptids von je 100 mg Harz erfolgte mit 2 ml Trifluoressigsäure unter Zusatz von 0,1 ml Thioanisol und 100 µg Thiokresol innerhalb von 90 min. Die Sequenz wurde durch Sequenzanalyse des freien Peptids bestätigt; durch HPLC-

Prüfung wurde ein einheitlicher Peak mit über 90 % ermittelt. Aminosäurenanalyse und Prüfung auf Enantiomerenreinheit an chiraler Phase ergaben die erwarteten Werte.

Wirksamkeitstests

5

A)

Unter SPF-Bedingungen gezüchtete, 3 Monate alte BALB/c-Inzuchtmäuse wurden intravenös mit 100 μg Pam₃Cys-Ser-Ser-[NP 147-158] immunisiert. (100 μg Pam₃Cys-Ser-Ser-[NP 147-158], aufgenommen in 300 μl PBS, 1 min beschallt). Nach 28 Tagen wurden die Mäuse mit 0,2 bzw. 0,4 haemagglutinierenden Einheiten Influenza-Virus A/PR/8 intranasal infiziert. Analog wurden zur Kontrolle Mäuse infiziert, denen 300 μl PBS intravenös appliziert wurde. Der Verlauf der Infektion wurde anhand von täglichen Gewichtskontrollen und der Überlebensrate kontrolliert. 11 von 12 Kontrolltieren, die mit 0,4 haemagglutinierenden Einheiten infiziert wurden, starben nach 11 Tagen an der Virusinfektion, während von den immunisierten Tieren nur 4 von 12 starben.

Eine weitere Kontrollgruppe und eine mit Pam₃Cys-Ser-Ser-[NP 147-158] immunisierte Gruppe wurden mit 0,2 haemagglutinierenden Einheiten Influenza-Virus infiziert. Nach 18 Tagen lebten noch 40 % der Kontrolltiere (4 von 10 Tieren), während 75 % der immunisierten Tiere lebten. Am Tag 18 betrug die Gewichtsdiﬀerenz zwischen immunisierten Tieren und Kontrolltieren 4 g. Die überlebenden Tiere der Kontrollgruppe verloren weiter an Gewicht, während sich die Immunisierten Tiere langsam von der Infektion erholten.

B)

Zytotoxische T-Zell-Aktivität von Milzzellen aus BALB/c-Mäusen nach Immunisierung mit freiem Peptid, Virus oder Pam₃Cys-Ser-Ser-Peptid (Fig. 1)

BALB/c-Mäuse erhielten durch intravenöse Applikation in 300 μl PBS

a) 8×10^7 mit 1,6 μM Nukleoproteinpeptid 147-158 (R-) vorinkubierte, syngene Milzzellen; (A, D, G),

b) 8×10^7 mit 160 μM Pam₃Cys-Ser-Ser-[NP 147-158 (R-)]-Lipopeptid vorinkubierte, syngene Milzzellen; (C,F),

c) 50 haemagglutinierende Einheiten von Influenza A-Virus PR/8/34; (B,E,H),

d) 100 μg Pam₃Cys-Ser-Ser-[NP 147-158 (R-)]; (I).

Nach 6 Tagen wurden den immunisierten bzw. infizierten Tieren die Milzen entnommen und die Milzzellen 5 Tage lang mit Peptid (A bis F) oder mit Virus PR8 infizierten, syngen Stimulatorzellen (G,H,I) restimuliert. Dazu wurden je $2,5 \times 10^7$ Zellen kultiviert in 10 ml α -MEM-Medium (Hersteller: Gibco), angereichert mit 10 % fötalem Kälberserum, 2-Mercaptoethanol, Glutamin und Antibiotika unter Zusatz von entweder 80 nM NP 147-158(R-)-Peptid (A,F) oder von 5×10^6 -Virus PR8-infizierten, mit 20 Gy bestrahlten syngen Milzzellen (G,H,I). Die Infektion von Stimulator und Zielzellen wurde wie beschrieben durchgeführt (Eur. J. Immunol. 7, 630 - 635 (1977)).

Die Aktivität der zytotoxischen T-Zellen wurde durch einen ⁵¹Cr-Release-Standardtest (Eur. J. Immunol. 137, 2.676 -2.681 (1986)) ermittelt. Schaubilder A, B, C und G, H, I zeigen die CTL-Aktivität auf unbehandelte (Δ) oder PR8 infizierte (\blacktriangle) P815 (MHC:H-2^d)-Zielzellen.

Schaubilder D, E und F zeigen CTL-Aktivität auf P815-Zellen, die mit verschiedenen Konzentrationen von freiem Peptid 30 min bei 37 °C vorbehandelt wurden. Hier wurde ein Verhältnis von Effektor zu Zielzelle 30 : 1 eingesetzt.

C)

Aktivität zytotoxischer T-Zellen nach Immunisierung von Mäusen mit Pam₃Cys-Ser-Ser-[NP 147-158] oder Pam₃Cys-Ser-Ser-[NP 365 - 380] (Fig. 2)

BALB/c-Mäuse (Schaubilder A,B) oder (B6 x DBA/2)-F1-Mäuse (C,D) wurden mit Influenza A-Virus (A,C) bzw. mit 100 μg Pam₃Cys-Ser-Ser-[NP 147-158] (Bild B) bzw. mit 100 μg Pam₃Cys-Ser-Ser-[NP 365-380] (Bild D) immunisiert. Nach 6 Tagen wurden die Milzen entnommen und die Milzzellen, wie unter B) beschrieben, in Gegenwart von 0,8 μM NP 147-158 Peptid (A,B) bzw. 0,8 μM NP 365-380 Peptid (C,D) stimuliert. Die Aktivität der zytotoxischen T-Zellen wurde anschließend auf unbehandelte P815-Zielzellen (Δ), auf PR8 infizierte P815-Zielzellen (\blacktriangle) und auf 90 min bei 37 °C mit NP 147-158-Peptid vorinkubierte P815-Zielzellen (\blacksquare) geprüft; ebenso auf unbehandelte EL-4-(MHC H-2^d)-Zellen (\circ), auf PR8 infizierte EL-4-Zielzellen (\ast), und auf 90 min bei 37 °C mit NP 365-380-Peptid vorinkubierte EL-4-Zellen (\diamond).

D)

Prüfung auf MHC Klasse I-Restriktion und auf Spezifität der Immunisierung mit Lipopeptid (Fig. 3)

BALB/c-Mäuse (Bilder A,B,C) oder (86 x DBA/2)-F1-Mäuse (Bilder D-I) erhielten i.v. in 300 µl PBS 100 µg Pam₃Cys-Ser-Ser-[NP 147-158(R-)] (Bilder A,E,H) bzw. 50 µg Ser-Ser-[NP 147-158(R-)] (Bild B) bzw. 50 µg [NP 147-158(R-)] (Bild C) bzw. 50 haemagglutinierenden Einheiten Influenza PR8-Virus (Bilder D,G) bzw. 100 µg Pam₃Cys-Ser-Ser-[NP 365-380] (Bilder F,I).

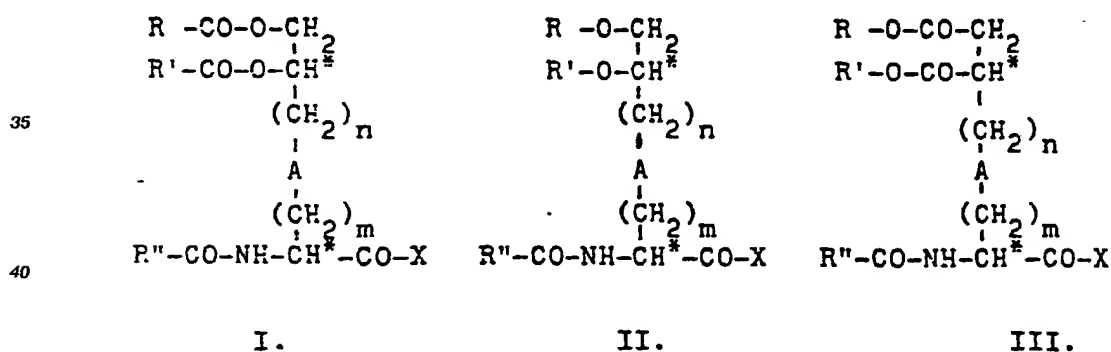
Sechs Tage nach der Injektion wurden die Milzzellen, wie in Beispiel 2 beschrieben, kultiviert unter Zusatz von Nukleoprotein 147-158(R-)-Peptid (Bilder A - F), oder Nukleoprotein 365-380-Peptid (Bilder G - I). Die Aktivität der erhaltenen cytotoxischen T-Zellen wurde bestimmt gegen

- unbehandelte P815-Zielzellen (Δ)
- 90 min bei 37° C mit NP 147-158(R-) vorinkubierte P815-Zielzellen (\blacksquare)
- 90 min bei 37° C mit NP 365-380 vorinkubierte P815-Zielzellen (\square)
- unbehandelte EL-4-Zielzellen (\circ)
- 90 min bei 37° C mit NP 147-158(R-) vorinkubierte EL-4-Zielzellen (\diamond)
- 90 min bei 37° C mit NP 365-380 vorinkubierte EL-4-Zielzellen (\clubsuit).

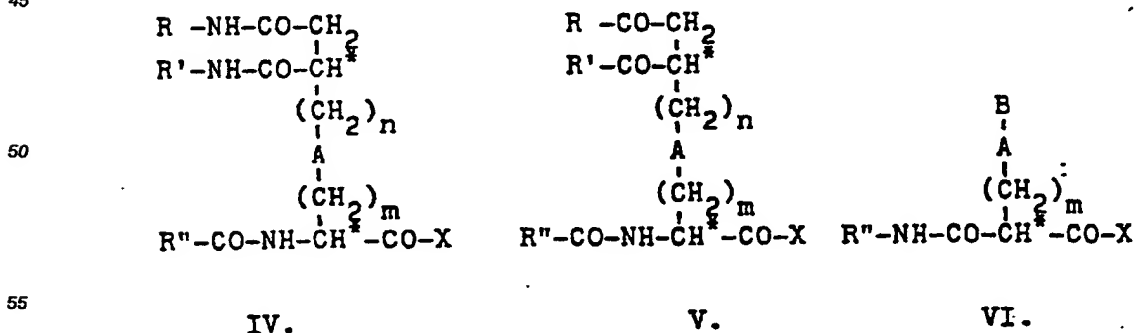
Ansprüche

1. Synthetische Vakzine zur spezifischen Induktion von zytotoxischen T-Lymphozyten, dadurch gekennzeichnet, daß sie aus einem Konjugat aus mindestens einer Membranankerverbindung und einem mindestens ein Killer-T-Zellepitop enthaltenden Protein eines Virus, eines Bakteriums, eines Parasiten oder eines Tumorantigens oder mindestens einer mindestens ein Killer-T-Zellepitop enthaltenden Partialsequenz eines Virus-, Bakterium- oder Parasiten-Proteins oder eines Tumorantigens besteht.
2. Synthetische Vakzine gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Membranankerverbindung ein bakterielles Membran-Lipoprotein ist.
3. Synthetische Vakzine gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Membranankerverbindung eine der nachstehenden Formeln aufweist

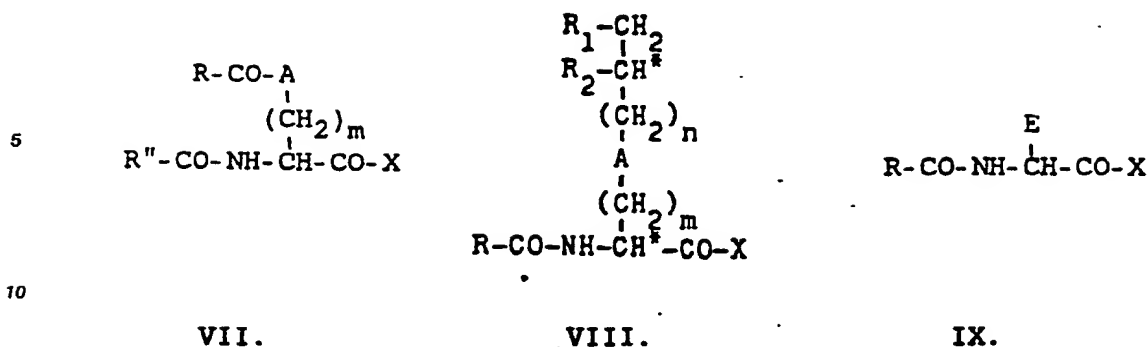
30



45



55



in denen A Schwefel, Sauerstoff, Disulfid (-S-S-), Methylen (-CH₂-) oder -NH- sein kann;
 n = 0 bis 5, m = 1 oder 2;

C* ein asymmetrisches Kohlenstoffatom mit R- oder S-Konfiguration ist,
 R, R' und R'' gleich oder verschieden sind und Wasserstoff oder eine Alkyl-, Alkenyl- oder Alkynylgruppe mit 7 bis 25 Kohlenstoffatomen sind, welche mit Hydroxy-, Amino-, Oxo-, Acyl-, Alkyl- oder Cycloalkylgruppen substituiert sein kann, E in Formel IX Wasserstoff oder eine beliebige Seitenkette einer natürlichen oder
 20 artifiziellen Aminosäure sein kann, B in Formel VI die Bedeutung jedes der in den Formeln I - V aufgeführten -(CH₂)_n-(substituiertes Alkyl)-Reste haben kann und R₁ und R₂ gleich oder verschieden sind und dieselben Bedeutungen wie R, R' und R'' haben, aber auch -OR, -O-COR, -COOR, -NHCOR oder -CONHR sein können, wobei X eine Kette von bis zu 10 Aminosäuren ist, an die das Protein oder die
 25 Partialsequenz des Virus-, Bakterium- oder Parasiten-Proteins oder eines Tumorantigens gebunden ist, oder das Protein oder die Partialsequenz selbst ist.

4. Synthetische Vakzine gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Membrananker Verbindung N-Palmitoyl-S- 2,3-(bispalmitoyloxy)-propyl cysteinyl-seryl-serin ist, wobei die Partialsequenz an den terminalen Serinrest gebunden ist.

5. Synthetische Vakzine gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 - 4, dadurch gekennzeichnet, daß
 30 das Protein oder die Partialsequenz von einem Adenovirus, HIV, Influenza-Virus, LCMV, MCMV, Hepatitis-Virus, HTLV, FELV, Treponema pallidum, Gonokokkus, Bordetella pertussis oder Plasmodium spec. oder einem anderen ein Killer-T-Zell-Epitop enthaltenden Pathogen stammt.

6. Synthetische Vakzine gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 - 5, dadurch gekennzeichnet, das
 35 ein Gemisch aus Membranankerwirkstoffkonjugaten mit verschiedenen Partialsequenzen vorliegt.

7. Synthetische Vakzine gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, das neben Membranankerwirkstoffkonjugaten zur Induktion zytotoxischer T-Lymphozyten auch Membranankerwirkstoffkonjugate zur Erzeugung neutralisierender Antikörper vorhanden sind.

8. Verfahren zur Herstellung einer synthetischen Vakzine gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 - 7,
 40 dadurch gekennzeichnet, daß ein Membranankerwirkstoffkonjugat nach bekannten Methoden synthetisiert wird.

9. Pharmazeutische oder veterinärmedizinische Zubereitung zur Induktion von zytotoxischen T-Lymphozyten, gekennzeichnet durch einen Gehalt an einer synthetischen Vakzine gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 - 7, gegebenenfalls neben üblichen Hilfs- und/oder Trägerstoffen und gegebenenfalls neben
 45 weiteren Vakzinen.

10. Verfahren zur Immunisierung von Menschen oder Säugetieren, dadurch gekennzeichnet, das eine Vakzine gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 - 7 oder eine pharmazeutische oder veterinärmedizinische Zubereitung gemäß Anspruch 9 verabreicht wird.

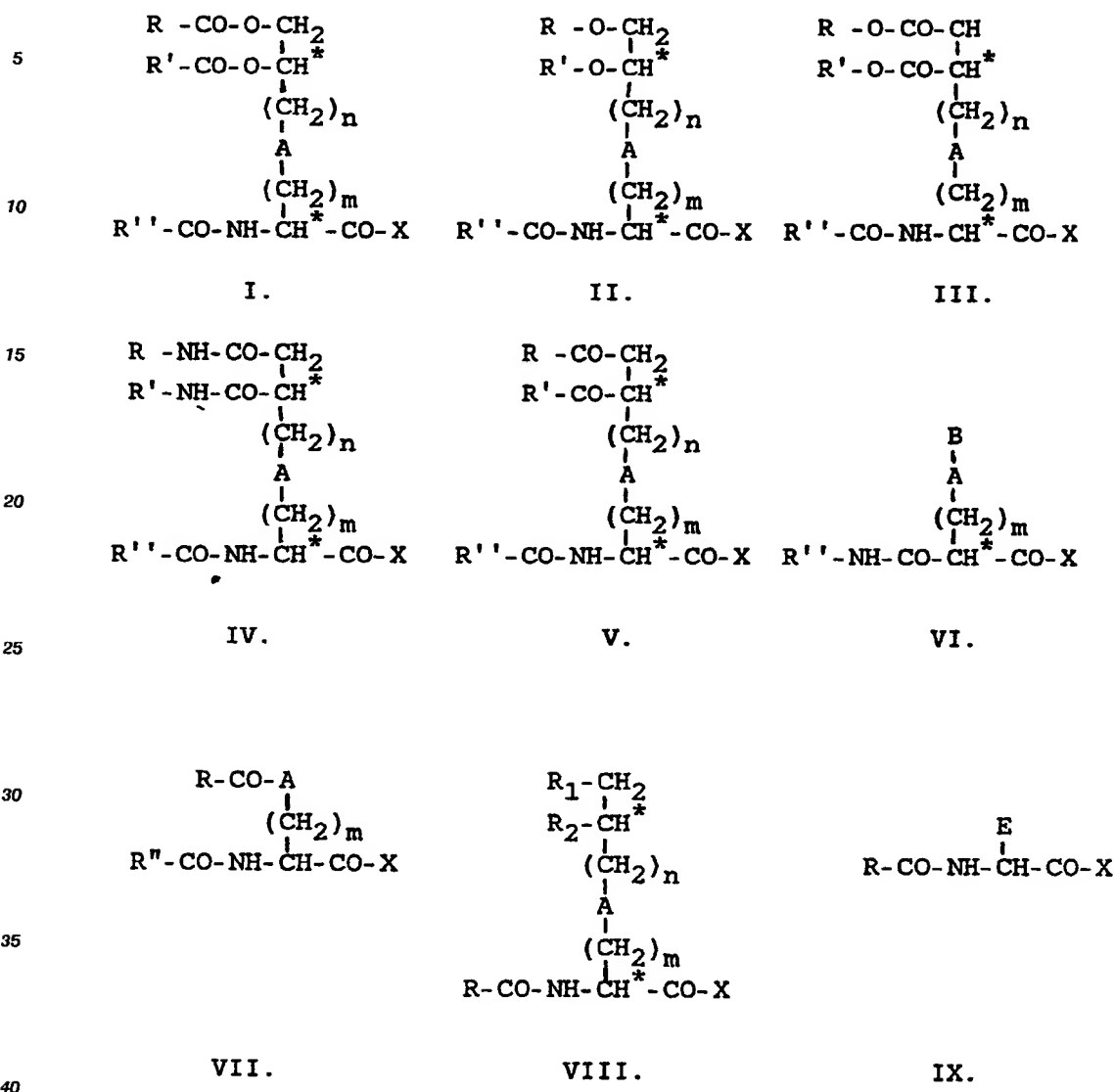
Patentansprüche für folgende Vertragsstaaten: ES, GR:

1. Verfahren zum Herstellen einer synthetischen Vakzine zur spezifischen Induktion von zytotoxischen T-Lymphozyten, die aus einem Konjugat aus mindestens einer Membrananker Verbindung und einem mindestens ein Killer-T-Zellepitop enthaltenden Protein eines Virus, eines Bakteriums, eines Parasiten oder eines Tumorantigens oder mindestens einer mindestens ein Killer-T-Zellepitop enthaltenden Partialsequenz eines Virus-, Bakterium- oder Parasiten-Proteins oder eines Tumorantigens besteht, dadurch gekennzeichnet, daß
 50 ein Membranankerwirkstoffkonjugat nach bekannten Methoden synthetisiert wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Membrananker Verbindung ein bakterielles Membran-Lipoprotein ist.

3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Membrananker Verbindung eine der

nachstehenden Formeln aufweist



in denen A Schwefel, Sauerstoff, Disulfid (-S-S-), Methylen (-CH₂-) oder -NH- sein kann;

n = 0 bis 5, m = 1 oder 2;

C* ein asymmetrisches Kohlenstoffatom mit R- oder S-Konfiguration ist,

R, R' und R'' gleich oder verschieden sind und Wasserstoff oder eine Alkyl-, Alkenyl- oder Alkynylgruppe mit 7 bis 25 Kohlenstoffatomen sind, welche mit Hydroxy-, Amino-, Oxo-, Acyl-, Alkyl- oder Cycloalkylgruppen substituiert sein kann, E in Formel IX Wasserstoff oder eine beliebige Seitenkette einer natürlichen oder artifiziellen Aminosäure sein kann, B in Formel VI die Bedeutung jedes der in den Formeln I - V aufgeführten -(CH₂)_n-(substituiertes Alkyl)-Reste haben kann und R₁ und R₂ gleich oder verschieden sind und dieselben Bedeutungen wie R, R' und R'' haben, aber auch -OR, -O-COR, -COOR, -NHCOR oder -CONHR sein können, wobei X eine Kette von bis zu 10 Aminosäuren ist, an die das Protein oder die Partialsequenz des Virus-, Bakterium- oder Parasiten-Proteins oder eines Tumorantigens gebunden ist, oder das Protein oder die Partialsequenz selbst ist.

4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Membranankerverbindung N-Palmitoyl-S-2,3-(bispalmitoyloxy)-propyl - cysteinyl-seryl-serin ist, wobei die Partialsequenz an den terminalen Serinrest gebunden ist.

5. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Protein oder die Partialsequenz von einem Adenovirus, HIV, Influenza-Virus, LCMV, MCMV, Hepatitis-Virus, HTLV, FELV, Treponema pallidum, Gono-

kokkus, Bordetella pertussis oder Plasmodium spec. oder einem anderen ein Killer-T-Zell-Epitop enthaltenden Pathogen stammt.

6. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß ein Gemisch aus Membranankerwirkstoffkonjugaten mit verschiedenen Partialsequenzen hergestellt wird.

- 5 7. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß eine Vakzine hergestellt wird, in der neben Membranankerwirkstoffkonjugaten zur Induktion zytotoxischer T-Lymphozyten auch Membranankerwirkstoffkonjugate zur Erzeugung neutralisierender Antikörper vorhanden sind.

10

15

20

25

30

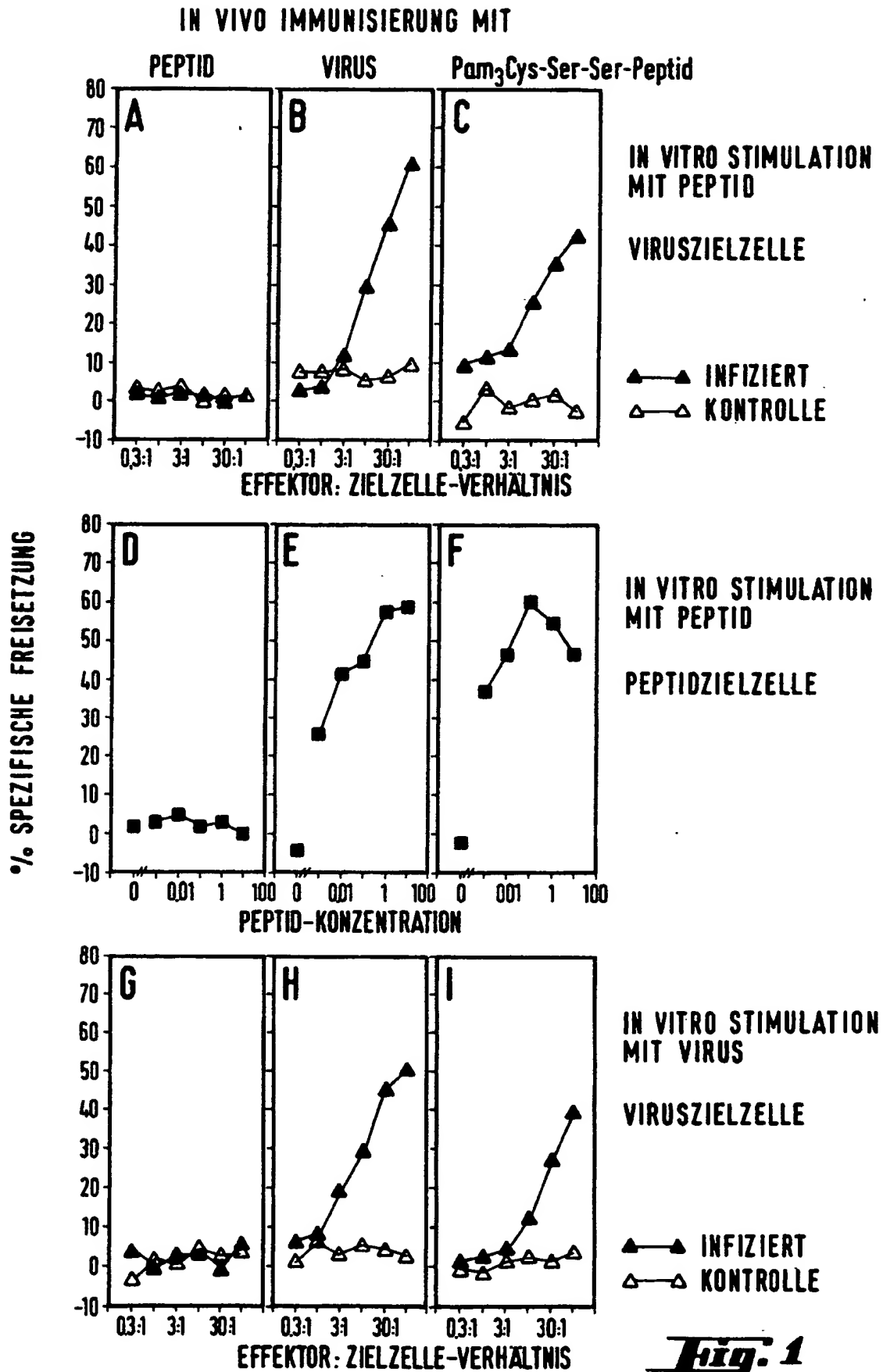
35

40

45

50

55



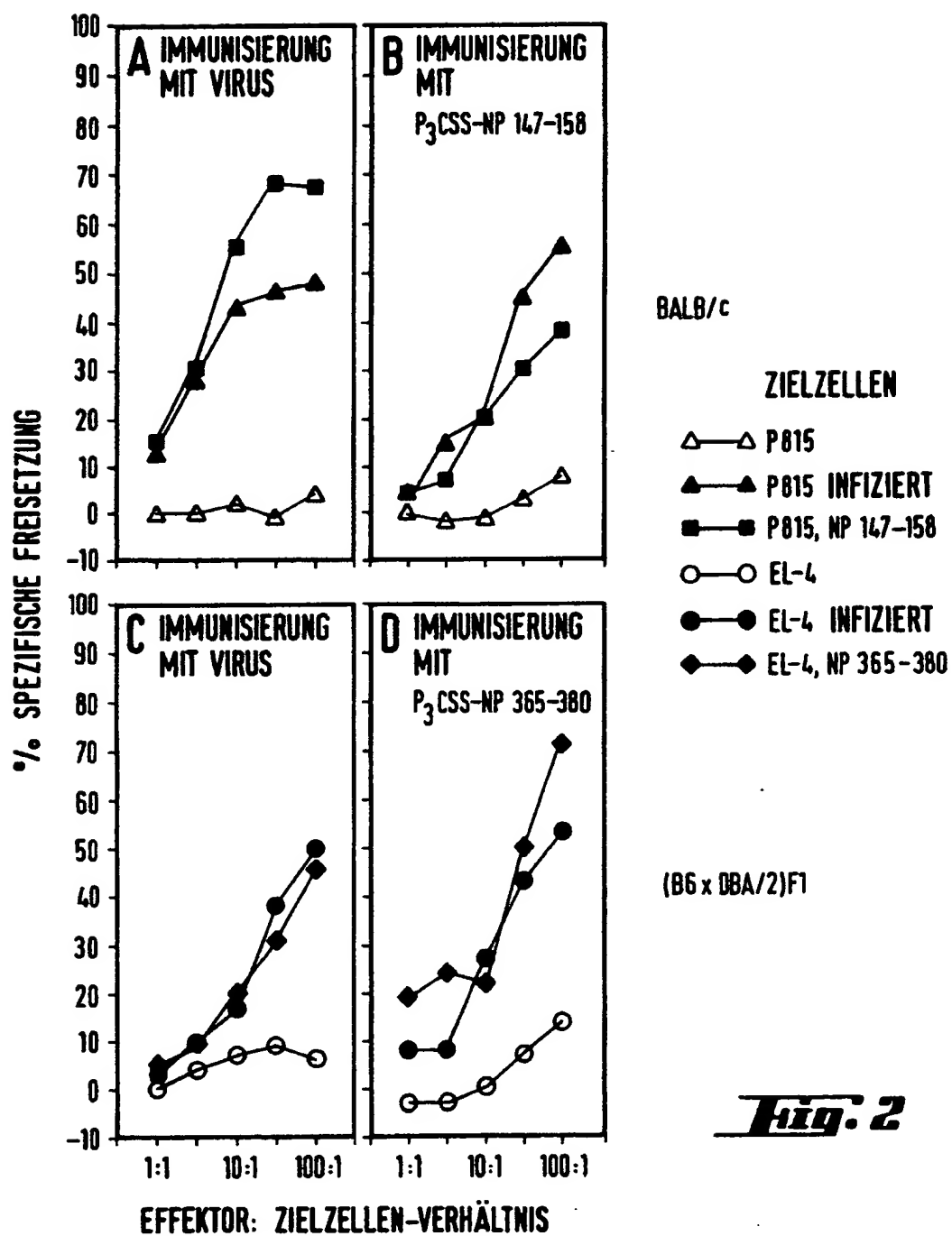


Fig. 2

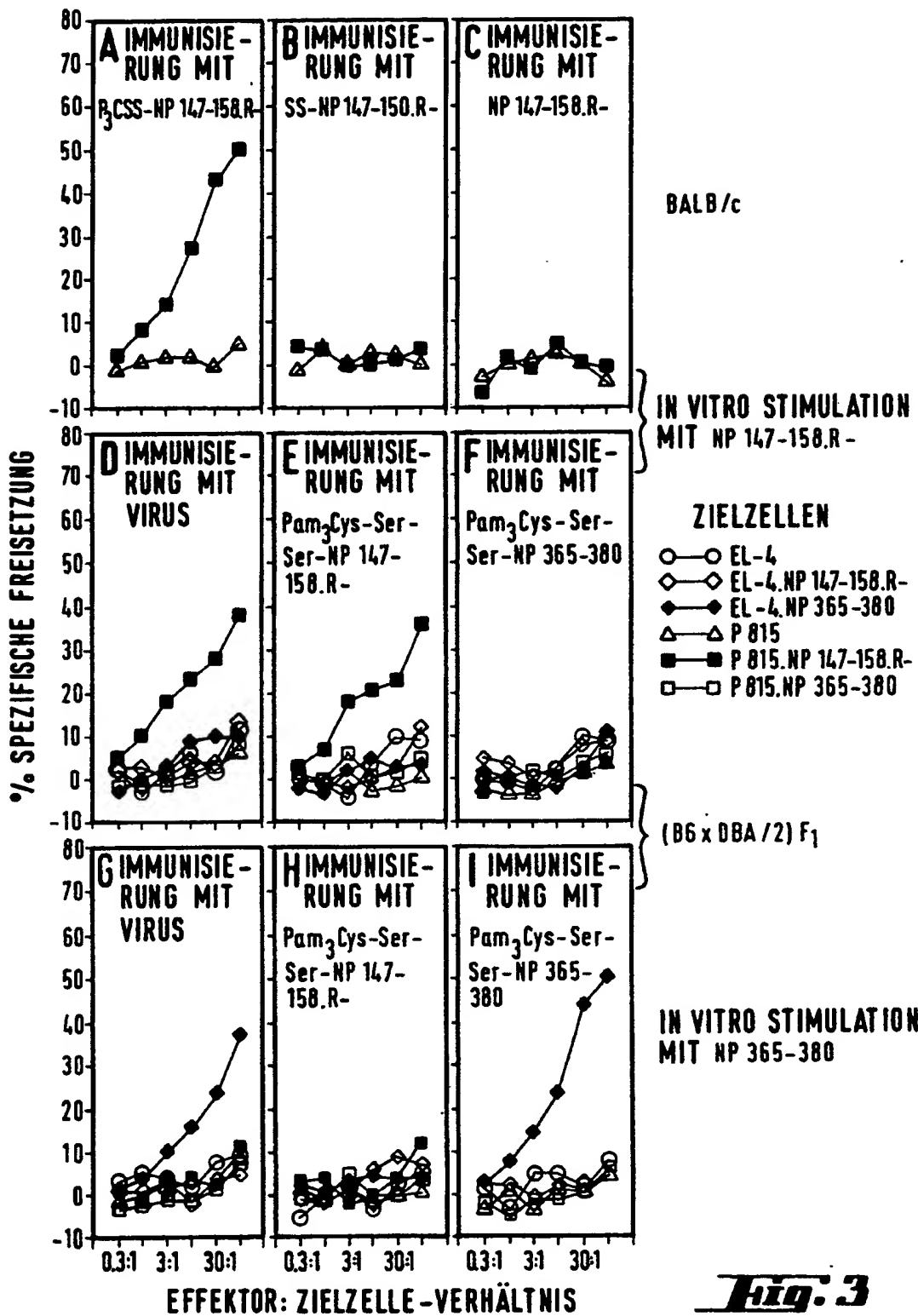


Fig. 3



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER TEILRECHERCHENBERICHT,
der nach Regel 45 des Europäischen Patent-
Übereinkommens für das weitere Verfahren als
europäischer Recherchenbericht gilt

Nummer der Anmeldung

EP 90 12 1189

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl.4)
X,D	EP-A-0 210 412 (HOECHST AG.) * Insgesamt; besonderes Seite 7, Zeilen 5-23; Ansprüche *	1-9	A 61 K 39/145 A 61 K 39/385
Y	--	1-9	
Y	WO-A-89 02 277 (BOARD OF REGENTS, UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM) * Insgesamt; besonderes Seite 9, Zeilen 14-19 und Seite 24, Zeilen 27-30 *	1-9	
X,P	NATURE, Band 342, 30. November 1989, Seiten 561-564; K. DERES et al.: "In vivo priming of virus-specific cytotoxic T lymphocytes with synthetic lipopeptide vaccine" ./.		
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl.4)
			A 61 K C 07 K
UNVOLLSTÄNDIGE RECHERCHE			
<p>Nach Auffassung der Recherchenabteilung entspricht die vorliegende europäische Patentanmeldung den Vorschriften des Europäischen Patentübereinkommens so wenig, daß es nicht möglich ist, auf der Grundlage einiger Patentansprüche sinnvolle Ermittlungen über den Stand der Technik durchzuführen.</p> <p>Vollständig recherchierte Patentansprüche: 1-9 Unvollständig recherchierte Patentansprüche: Nicht recherchierte Patentansprüche: 10 Grund für die Beschränkung der Recherche:</p> <p>Verfahren zur chirurgischen oder therapeutischen Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers (Siehe Art. 52(4) des Europäischen Patentübereinkommens)</p>			
Recherchenort DEN HAAG		Abschlußdatum der Recherche 25-02-1991	Prüfer FERNANDEZ BRANAS
<p>KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTEN</p> <p>X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : mündliche Offenbarung P : Zwischenliteratur T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze</p> <p>E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument</p>			



EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl. 4)
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	betrifft Anspruch	
A	* Der ganze Artikel *	1-9	
	--		
	EP-A-0 338 437 (HOECHST AG.)		
A	* Insgesamt *	1-9	
	--		
	EP-A-0 203 676 (THE WISTAR INSTITUTE OF ANATOMY AND BIOLOGY)		
A	* Insgesamt *	1-9	RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl. 4)
	--		
	WO-A-89 07 448 (REGENTS OF THE UNIVERSITY)		
A	* Insgesamt *	1-9	
	--		
	EP-A-0 000 300 (CIBA-GEIGY AG)		
A	* Insgesamt *	1-9	
	--		
	THE EMBO JOURNAL, Band 7, Nr. 1, 1988, Seiten 93-100, IRL Press Ltd, Oxford, GB; J.B. ROTHBARD et al.: "A sequence pattern common to T cell epitopes"		
A	* Der ganze Artikel *	1-9	
	--		
	CELL, Band 52, 1988, 29. Januari 1988, Seiten 253-258, Cell Press; H.C. BODMER et al.: "Enhanced recognition of a modified peptide antigen by cytotoxic T cells specific for influenza nucleoprotein"		
A	* Der ganze Artikel *	1-9	

SYNTHETIC VACCINE FOR SPECIFIC INDUCTION OF
CYTOTOXIC T-LYMPHOCYTES
[Synthetische Vakzine zur spezifischen Induktion
zytotoxischer T-Lymphozyten]

Guenther Jung, Hans-Georg Rammensee, Karl Deres,
and Karl-Heinz Wiesmueller

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
Washington, D.C. November 2001

Translated by: Schreiber Translations, Inc.

Country : Europe

Document No. : 0,431,327

Document Type : Published patent application

Language : German

Inventor : Guenther Jung, Hans-Georg
Rammensee, Karl Deres, and Karl-
Heinz Wiesmueller

Applicant : Hoechst Aktiengesellschaft,
Frankfurt am Main, Germany

IPC : A61K 39/145, A61K 39/385

Application Date : November 6, 1990

Publication Date : June 12, 1991

Foreign Language Title : Synthetische Vakzine zur
spezifischen Induktion
zytotoxischer T-Lymphozyten

English Title : **SYNTHETIC VACCINE FOR SPECIFIC
INDUCTION OF CYTOTOXIC T-
LYMPHOCYTES**

Synthetic Vaccine for Specific Induction of Cytotoxic T-Lymphocytes

A synthetic vaccine for the specific induction of cytotoxic T-lymphocytes consists of a conjugate of at least one membrane anchoring compound and a protein of a virus, a bacteria, a parasite, or a tumor antigen containing at least one killer T-cell epitope, or at least one partial sequence of a virus, bacteria, or parasite protein, or a tumor antigen containing at least one killer T-cell epitope.

SYNTHETIC VACCINE FOR SPECIFIC INDUCTION OF CYTOTOXIC T-LYMPHOCYTES

The invention concerns a synthetic vaccine for the specific induction of cytotoxic T-lymphocytes.

Cytotoxic T-lymphocytes (killer T-cells) represent an essential part of the immune response of warm blooded beings against intracellular infections. The cytotoxic T-lymphocytes are normally only induced by means of an in-vivo injection with infectious pathogens (J. Bastin et al, J. Exp. Med., Vol. 165, June 1987). Because of the risks connected therewith, a synthetic injection for the specific induction of cytotoxic T-

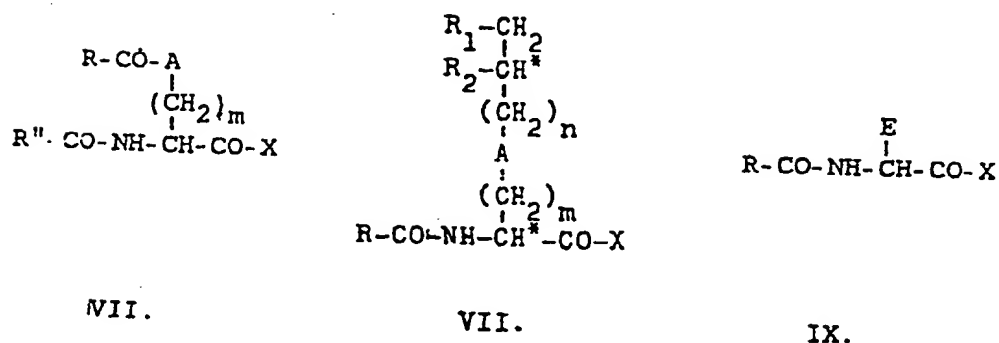
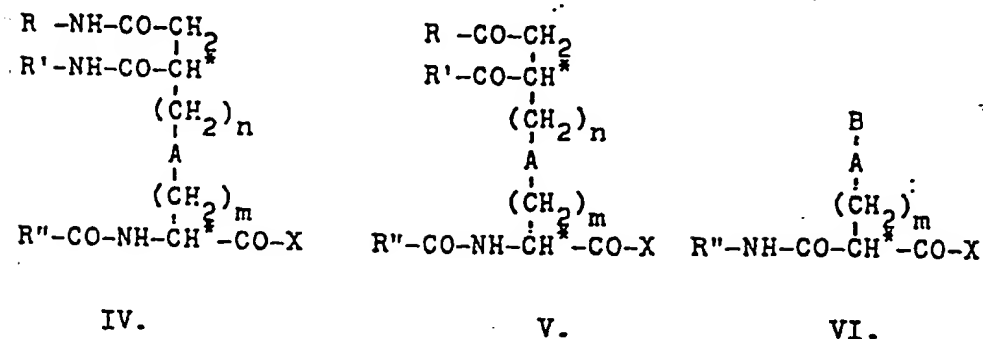
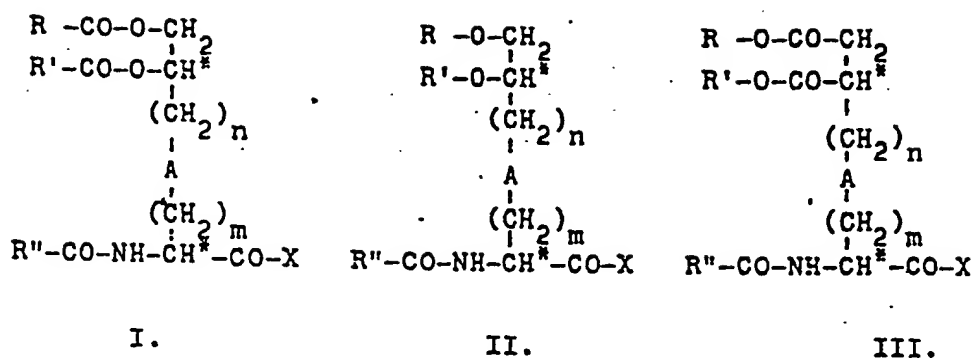
¹ Numbers in the margin indicate pagination in the foreign text.

lymphocytes represents a considerable improvement. It was now surprisingly found that by using specific membrane anchoring active ingredient conjugates containing killer T-cell epitopes, the specific in-vivo induction of cytotoxic T-lymphocytes is possible.

It is however already known that membrane anchoring active ingredient conjugates are suitable for producing neutralizing antibodies (see Applied Chem. 97 (1985), No. 10, starting at page 883); about a synthetic vaccine containing membrane anchoring active ingredient conjugates for the specific induction of cytotoxic T-lymphocytes there had been no reports until now.

The object of the invention is therefore a synthetic vaccine for the induction of cytotoxic T-lymphocytes which is characterized in that it consists of a conjugate of at least one membrane anchoring compound and a protein of a virus, a bacteria, a parasite, or a tumor antigen containing at least one killer T-cell epitope, or at least one partial sequence of a virus, bacteria, or parasite protein, or a tumor antigen containing at least one killer T-cell epitope.

The mentioned membrane compound is preferably a bacterial lipoprotein. Particularly preferred as membrane anchoring compound is a compound having the following formulas



wherein A can be sulphur, oxygen, disulfide (-S-S-), methylene (-CH₂-), or -NH-;

n = 0 to 5, m = 1 or 2;

C* is an asymmetric carbon atom with R or S configuration;

R, R', and R'' are identical or different, and are hydrogen or alkyl, alkenyl, or alkynyl groups with 7 to 25 carbon atoms, which can be substituted with hydroxy, amino, oxo, acyl, alkyl, or cycloalkyl groups; E can be, in the formula IX, hydrogen or any desired secondary chain of a natural or artificial α -amino acid; B can have in the formula VI the meaning of each of the $(CH_2)_n$ -(substituted alkyl) residues listed in the formulas I-V, and R₁ and R₂ are identical or different and have the same meaning as R, R', and R'', but can also be OR, O-COR, COOR, NHCOOR, or CONHR, wherein X is a chain of up to 10 amino acids on which the protein or the partial sequence of the virus, bacteria, or parasite protein or a tumor antigen is bonded, or is the protein or the partial sequence itself.

Of these are particularly emphasized as examples: N-terminals occurring in bacterial lipoproteins such as, for example, Y-Ser-Ser-Ser-Asn, Y-Ile-Leu-Leu-Ala, Y-Ala-Asn-Asn-Gin, Y-Asn-Ser-Asn-Ser, Y-Gly-Ala-Met-Ser, Y-Gin-Ala-Asn-Tyr, Y-Gin-Val-Asn-Asn, Y-Asp-Asn-Ser-Ser, wherein Y can be a residue listed under formula I to VII. These lipopentapeptides can also be used in shortened form (lipodipeptides, lipotriptides, or lipotetraptides) as membrane anchoring compound. Particularly especially preferred is

/4

N-palmitoyl-S-[2,3(bispalmitoyloxy)propyl]-cysteinyI-seryl-serin, (Pam₃Cys-Ser-Ser), N-palmitoyl-S-[2,3-(bispalmitoyloxy)propyl]-cysteinyI-seryl-glycine and N-palmitoyl-S-[2,3-(bispalmitoyloxy)propyl]-cysteinyI alanyl-D-isoglutamine.

Also particularly preferred are the compounds having the formulas I and III, especially compounds having the formula I.

The substituent A is preferably sulphur or methylene, especially preferably sulphur.

The substituents R, R', and R'' are preferably alkyl residues with 14 to 18 C atoms, especially preferred are alkyl residues with 16 C atoms.

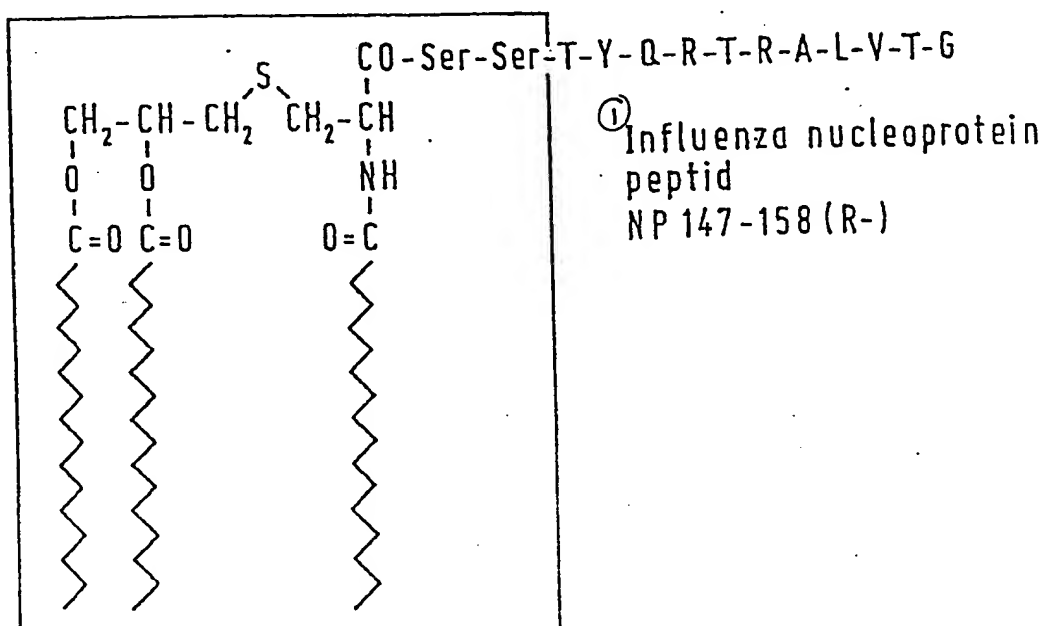
The substituent X is preferably formed by 1 to 2 polar amino acid esters, especially preferred is the serin residue.

For the vaccine according to the invention, for coupling to the membrane anchoring compound, are suitable different proteins or protein partial sequences of intracellularly occurring disease pathogens, viruses, bacteria, or parasite proteins or tumor antigens, which are recognized by the killer T-cells.

These proteins or partial sequences (also designated as killer T-cell epitopes) are characterized in that the cytotoxic T-lymphocytes are recognized together with MCH molecules (major histocompatibility complex).

The vaccine according to the invention is suitable for immunizing against all pathogens which have killer T-cell

epitopes such as, for example, adenoviruses, HIV, influenza viruses, LCMV, MCMV, hepatitis viruses, HTLV, FELV, Treponema pallidum, Gonococcus, Bordetella pertussis, plasmodias, listerias, mycobacteria, or leishmanias. The already known killer T-cell epitopes are shown in the following table in partial sequences of which the influenza nucleoprotein P₃CSS-NP 147-158(R-) and the HIV epitopes are of particular importance.



② Lipotripeptid Pam₃Cys-Ser-Ser

Keys to figure: (1) Influenza nucleoprotein peptide; (2) Lipotripeptide Pam₃Cys-Ser-Ser.

Organismus	Protein	von - bis	Restr.	Sequenz
Adenovirus Ad5E1A			Db	PSNTPPEI
HIV	env (gp 120)	381-392	HLA A2	(K)NCGGEFFYCNS
HIV	env (gp 120)	308-322	Dd	RIQRGRPGRAFTIGK
HIV	env (gp 120)	410-429	DR4	GSDTITLPCRIKQFINMWQE
HIV	gag (p17)	418-443	A2	KEGHQMKDCTERQANF
HIV	gag (p17)	448-460	A2	GNFLQSRPEPTAPPA
HIV	gag (p24)	193-203	A2	GHQAAMEMLKE
HIV	gag (p24)	219-233	A2	HAGPLAPGQMREPRG
HIV	gag (p24)	265-280	B27	KRWIILGLNKIVRMYC
Influenza	Nucleoprotein	82-94	HLA A2	MVVKLGEFYNQMM
Influenza	Matrix	57-68	HLA A2	KGILGFVFTLTV
Influenza	Nucleoprotein	335-349	B37 B44 A2 Aw69	SAAFEDLRVLSFIRG
Influenza	Hemagglutinin H3	58-73	H-2 Ad	ILDGIDCTLIDALLGD
Influenza	Hemagglutinin H3	58-73	H-2 Ad	ILDGIDCTLIDALLGD
Influenza	Hemagglutinin	181-204 103-123	H-2K;H-2K	-
Influenza	Nucleoprotein	365-379		SDYEGRLIQNSLTI
Influenza	Nucleoprotein	335-349	H-2b	IASNENMETMESSTL
Influenza	Nucleoprotein	384-393	HLA B27	RYWAIRTRSG
Influenza	Nucleoprotein	147-158	Kd	TYQRTRALV (R) TG
A/NT/60/68	Nucleoprotein	118-126	Ld Lq	RPQASGVYM
LCMV	-	278-286	H-2b	VENPGGYCL
LCMV	-	277-293	H-2b	GVENPGGYCLTKWMILA
-	-	168-176	-	YPHFMPNLT
MCMV	-	161-179	Ld	GRLMYDMYPHFMPNLTG
P815	Tumor antigen P91A	12-24	Ld	ISTQNHRAIDLVA
Plasmodium falciparum, berghei	Circumsporozoite prot.	368-390	H-2K	KPKDELDYENDIEKKICKMEKCSC
	Circumsporozoite prot.	249-260	Kd	NDDSYIPSAEKI
yoelii	-	276-288	Kd	NEDSYVPSAEQI
Hepatitis B	HBsAg	21-28	-	PLGFFPDH

Column headings from left to right:

Organism, Protein, from - to, Restr., Sequence

With the aid of the vaccine according to the invention, it is also possible to mix different membrane anchoring compounds coupled to different partial sequences to obtain a vaccine which is optimally adapted for a specific target. Furthermore, a corresponding mixture can also contain additional membrane anchoring active ingredient conjugates, which stimulate the humoral immune response and also lead to the production of neutralizing antibodies (Vaccines 7, 29-33 (1989), Applied Chem., Int. Ed. 24, 872-873 (1989)). Furthermore, it is also possible to covalently link different partial sequences and to connect the same with a membrane anchoring compound.

The object of the invention is also a process for the production of a synthetic vaccine, which is characterized in that the proteins or partial sequences of pathogens are bonded by of a conjugation reaction to the membrane anchoring compound. The conjugation reaction can be, for example, a condensation, addition, substitution, oxidation, or disulfide formation. The preferred conjugation methods are described in the examples. Other conjugation methods are described in the already cited German patent publication 3,546,150.

The production of the membrane compounds is also described in detail in the last-mentioned German patent publication.

The also necessary separation of the diastereomers can take place according to the different methods, for example, in Hoppe-Seyler's Z. Physiolog. Chem. 364 (1983) 593.

The construction of the partial sequences to be used for the membrane anchoring active ingredient conjugate can take place in

/6

different ways known from the literature, see for example Wuensch et al, in Houben-Weyl, Vol. 15/1.2, Stuttgart, Thieme Publishers, or Wuensch in Applied Chem. 83 (1971), E. Gross and J. Meierhofer (published), The Peptides, Vol. 1 (1979), 2 (1979), 3 (1981), and 5 (1983), Academic Press, New York 7713 or the German patent publication 3,546,140. In the example 1, a preferred process for producing a partial sequence and a conjugate are explained in more detail.

Furthermore, the object of the invention are also pharmaceutical or veterinary medicinal preparations, which have a content of conjugate of at least one membrane anchoring compound and at least one partial sequence of one of the mentioned proteins or organisms. Normally, in addition to a solvent, no additional auxiliary and carrier substances or adjuvants for the preparations according to the invention are necessary. In many cases, however, it can be practical to add such auxiliary and/or carrier substances as well as, if necessary, adjuvants to the preparations according to the invention (Anton Mayr, Gerhard

Eissnen, Barbara Myr-Bibrack, Handbook of Vaccines in Animal Medicine, 1984, Paul Parey Publishers, Berlin-Hamburg).

The quantity of vaccine, which is necessary for the safe immunization of warm-blooded beings, depends upon the type of warm-blooded being, the membrane anchoring compound or compounds, and the protein or the partial sequence or sequences of the organism against which it is to be immunized, and it is to be determined empirically for each individual case.

The invention will be explained in more detail with reference to the following examples.

Synthesis

Example 1

Synthesis of N-palmitoyl-S-[2,3-(bispalmitoyloxy)-propyl]-seryl-seryl-NP 147-158

The influenza A virus nucleoprotein peptide sequence was synthesized by solid phase peptide synthesis. Fmoc amino acids were used. The following secondary chain protective groups were used: Thr(tBu), Tyr(tBu), Arg(Pmc). 1 g of para-benzoyloxy benzyl alcohol resin was used, loaded with 0.5 mmol of Fmoc-Gly, and the peptide sequence was constructed according to the following synthesis cycles. N-activation with 50% piperidine in DMF (1 x 10 min). Coupling with the following amino acids for 30 min. With BOP/HOBT [benzotriazol-1-yl-oxy-tris-(dimethyl amino)-phosphonium hexafluorophosphate/1-hydroxy benzotriazol] and

diisopropyl ethyl amine in DMF. Double couplings were carried out with 3-fold excess of diisopropyl ethyl amine (each with reference to free amino groups in the resin). After each double coupling, the peptide resin was washed three times with N-methyl pyrrolidone, dichloromethane, and N-methyl pyrrolidone.

After the synthesis of the resin-bonded influenza A virus nucleoprotein sequence, a part of the peptide was obtained by trifluoroacetic acid fission and tested as to purity by means of HPLC, MS, amino acid analysis, analysis as to the chiral phase, as well as sequence analysis. The HPLC test resulted in a purity of more than 90%. After coupling two serin residues [Fmoc-Ser(tBu)] to the resin-bonded peptide, a coupling of the tripalmitoyl-S-glycerin cysteine took place according to the DC/HOBT method. After four hours, an equivalent of N-methyl morpholine was added and, after another hour, the lipopeptide resin was washed. The lipopeptide was separated from 100 mg of resin by means of 2 ml of trifluoroacetic acid (with 100 μ l of thioanisol and 100 μ l of thiokresol) within an hour. To completely remove the Arg(Pmc) protective groups, it was additionally treated with trifluoroacetic acid for 30 min. at 50°C. The filtrate was evaporated, the residue was absorbed with acetic acid, and placed in cold water. The precipitated lipopetide was washed 3x with ether and lyophilized from tert. butanol/water in a ratio of 3:1.

Example 2

Synthesis of N-palmitoyl-S-[2,3-(bispalmitoyloxy)-propyl]cysteinyl-seryl-seryl-NP (365-380)

The synthesis took place similar as in Example 1. Fmoc amino acids were used with the following secondary chain protective groups: Ser(tBu), Glu(OtBu), Thr(tBu). The Asn was coupled without secondary chain protective group by means of diisopropyl carbodiimide/HOBT. As initial resin was used Fmoc-Glu(OtBu)-p-benzyloxy benzyl alcohol polystyrol, cross-linked with 1% of divinyl benzol. The loading on Fmoc-Glu(OtBu) amounted to 0.45 mmol/g. The fission of the peptide and Pam₃Cys-Ser-Ser-peptide from each 100 mg of resin took place with 2 ml of trifluoroacetic acid while adding 0.1 ml of thioanisol and 100 µg of thiokresol within 90 minutes. The sequence was confirmed by a sequence analysis of the free peptide; by a HPLC

/1

test was determined an individual peak of more than 90%. The amino acid analysis and test as to enantiometer units in the chiral phase resulted in the mentioned values.

Effectiveness Test

A)

3-month old BALB/c bred mice bred under SPF conditions were immunized intravenously with 100 µg of Pam₃cys-Ser-Ser-[NP-147-158]. (100 µg of Pam₃Cys-Ser-Ser-[NP 147-158], absorbed in 300

µl of PBS, acoustically irradiated for 1 minute). After 28 days, the mice were infected intranasally with 0.2 or 0.4 hemagglutinated units of influenza virus A/PR/8. Similarly, the control mice were infected, to which 300 µl of PBS had been applied intravenously. The course of the infection was controlled in view of daily weight controls and the survival rate. 11 of 12 control animals which had been infected with 0.4 hemagglutinated units died after 11 days of the virus infection, while of the immunized animals only 4 of 12 died.

Another control group and a group immunized with Pam₃Cys-Ser-Ser-[NP 147-158] was infected with 0.2 hemagglutinated units of influenza virus. After 18 days, 40% of the control animals were still alive (4 of 10 animals), while 75% of the immunized animals were alive. On day 18, the weight difference between the immunized animals and the control animals was of 4 g. The surviving animals of the control group lost more weight, while the immunized animals recovered slowly from the infection.

B)

Cytotoxic T-cell activity of micelles of BALB/c mice after immunization with free peptide, virus, or Pam₃Cys-Ser-Ser-peptide (Fig. 1).

BALB/c mice received by intravenous application 300 µl of PBS.

- a) 8×10^7 with $1.6 \mu\text{m}$ of nucleoprotein peptide 147-158 (R-) preincubated, syngeneic micelles; (A, D, G),
- b) 8×10^7 with $160 \mu\text{m}$ of Pam₃Cys-Ser-Ser-[NP 147-158(R-)] lipopeptide preincubated, syngeneic micelles; (C, F),
- c) 50 hemagglutinated units of influenza A virus PR/8/34; (B, E, H),
- d) 100 μg of Pam₃Cys-Ser-Ser-[NP 147-158(R-)]; (I).

After 6 days, the spleens of the immunized or infected animals were extracted and the micelles were infected for 5 days long with peptide (A to F) or with virus PR8, the syngeneic simulator cells (G, H, I) were restimulated. For this purpose, each one of the 2.5×10^7 cells was cultivated in 10 ml of a-MEM medium (manufacturer: Gibco), enriched with 10% of fetal calf serum, 2-mercapto ethanol, glutamine, and antibiotics by using either 80 nm of NP 147-158(R-) peptide (A, F) or of 5×10^6 virus PR8; the syngeneic micelles (G, H, I) were irradiated with 20 Gy. The infection of the stimulator and target cells was carried out as described (Eur. J. Immunol. 7, 630-635 (1977)).

The activity of the cytotoxic T-cells was determined with a ⁵¹Cr release standard test (Eur. J. Immunol. 137, 2,676-2,681 (1986)). Diagrams A, B, C, and G, H, I show the CTL activity on untreated (Δ) or PR8 infected (\blacktriangle) P815 (MHC.H-2^d) target cells.

Diagrams D, E, and F show CTL activity on P815 cells, which are pretreated with different concentrations of free peptide for

30 minutes at 37°C. Here, the ratio of effector to target cell is set to 30:1.

C)

The activity of cytotoxic T-cells after immunization of mice with Pam₃Cys-Ser-Ser-[NP 147-158] or Pam₃Cys-Ser-Ser-[NP 365-380] (Fig. 2).

BALB/c mice (Diagrams A, B) or (B6 x DBA/2)-F1 mice (C, D) were immunized with influenza A virus (A, C) or with 100 µg of Pam₃Cys-Ser-Ser-[NP 147-158] (Diagram B) or with 100 µg of Pam₃Cys-Ser-Ser-[NP 365-380] (Diagram D). After 6 days, the spleens were removed and the spleen cells were stimulated as described under (B) in the presence of 0.8 µm of NP 147-158 peptide (A, B) 0.8 µm of NP 365-380 peptide (C, D). The activity of the cytotoxic T-cells was additionally tested as to untreated P815 target cells (Δ), as to PR8 infected P815 target cells (▲), and with NP 147-158 peptide for 90 minutes at 37°C as to preincubated P815 target cells (■); also as to untreated EL-4- (MHC H-2^d) cells (○), as to PR8 infected EL-4-target cells (*), and with NP 365-380 for 90 minutes at 37°C as to preincubated EL-4-cells (◆).

/8

D)

Testing as to MHC class I restriction and as to specialty of immunization with lipopeptide (Fig. 3).

BALB/c mice (Diagrams A, B, C) or (86 x DBA/2)-F1 mice (Diagrams D-I) received i.v. 300 µl of PBS 100 µg of Pam₃Cys-Ser-Ser-[NP 147-158(R-)] (Diagrams A, E, H) or 50 µg Ser-Ser-[NP 147-158(R-)] (Diagram B) or 50 µg of [NP 147-158(R-)] (Diagram C) or 50 hemagglutinated units of influenza PR8 virus (Diagrams D, G) or 100 µg of Pam₃Cys-Ser-Ser-[NP 365-380] (Diagrams F, I).

Six days after the injection, the spleen cells were cultivated as described in Example 2 while adding nucleoprotein 147-158(R-)-peptide (Diagrams A-F) or nucleoprotein 365-380 peptide (Diagrams G-I). The activity of the obtained cytotoxic T cells was determined against

- untreated P815 target cells (Δ)
- 90 min at 37°C with NP 147-158(R-) preincubated P815 target cells (■)
- 90 min at 37°C with NP 365-380 preincubated P815 target cells (□)
- untreated EL-4 target cells (o)
- 90 min at 37°C with NP 147-148(R-) preincubated EL-4 target cells (◇)
- 90 min at 37°C with NP 365-380 preincubated EL-4 target cells (◆).

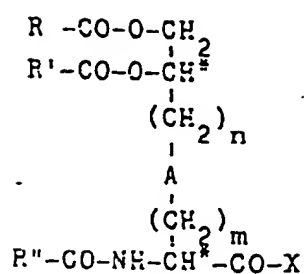
Claims

1. Synthetic vaccine for the specific induction of cytotoxic T-lymphocytes, characterized in that it consists of a conjugate of

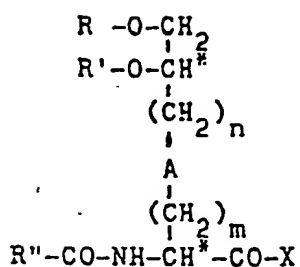
at least one membrane anchoring compound and a protein of a virus, a bacteria, a parasite, or a tumor antigen containing at least one killer T-cell epitope, or at least one partial sequence of a virus, bacteria, or parasite protein, or a tumor antigen containing at least one killer T-cell epitope.

2. Synthetic vaccine according to claim 1, characterized in that the membrane anchoring compound is a bacterial membrane lipoprotein.

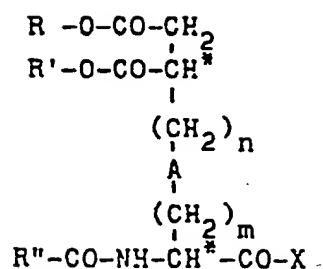
3. Synthetic vaccine according to claim 1, characterized in that the membrane anchoring compound has one of the following formulas



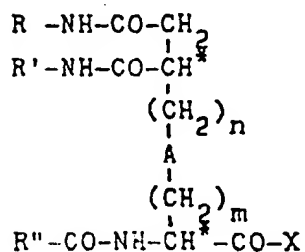
I.



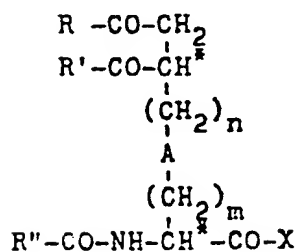
II.



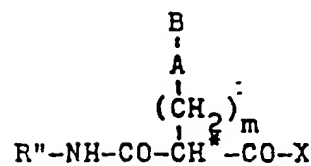
III.



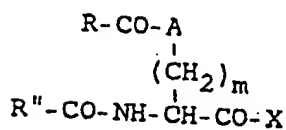
IV.



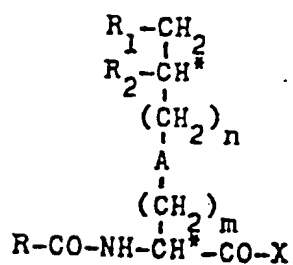
V.



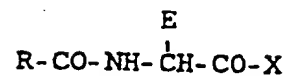
VI.



VII.



VIII.



IX.

wherein A can be sulphur, oxygen, disulfide (-S-S-), methylene (-CH₂-), or -NH-;

n = 0 to 5, m = 1 or 2;

C* is an asymmetric carbon atom with R or S configuration;

R, R', and R'' are identical or different, and are hydrogen or alkyl, alkenyl, or alkynyl groups with 7 to 25 carbon atoms, which can be substituted with hydroxy, amino, oxo, acyl, alkyl, or cycloalkyl groups; E can be, in the formula IX, hydrogen or any desired secondary chain of a natural or artificial α -amino acid; B can have in the formula VI the meaning of each of the (CH₂)_n-(substituted alkyl) residues listed in the formulas I-V; and R₁ and R₂ are identical or different and have the same meaning as R, R', and R'', but can also be OR, O-COR, COOR, NHCOOR, or CONHR, wherein X is a chain of up to 10 amino acids on which the protein or the partial sequence of the virus, bacteria, or parasite protein or a tumor antigen is bonded, or is the protein or the partial sequence itself.

4. Synthetic vaccine according to claim 1, characterized in that the membrane anchoring compound is N-palmitoyl-S-2,3-(bispalmitoyloxy)-propyl cysteinyl-seryl-serin, wherein the partial sequence is bonded to the terminal serin residue.

5. Synthetic vaccine according to one or several of the claims 1-4, characterized in that the protein or the partial sequence originates from an adenovirus, HIV, influenza virus, LCMV, MCMV,

hepatitis viruses, HTLV, FELV, Treponema pallidum, Gonococcus, Bordetella pertussis, or Plasmodium spec., or another pathogen containing a killer T-cell epitope.

6. Synthetic vaccine according to one or several of the claims 1-5, characterized in that a mixture of membrane anchoring active ingredient conjugates with different partial sequences is provided.

7. Synthetic vaccine according to claim 1, characterized in that, aside from the membrane anchoring active ingredient conjugates for the induction of cytotoxic T-lymphocytes, also membrane anchoring active ingredient conjugates are available for producing neutralizing antibodies.

8. Process for producing a synthetic vaccine according to one or several of the claims 1-7, characterized in that a membrane anchoring active ingredient conjugate is synthesized according to known methods.

9. Pharmaceutical or veterinary preparation for inducing cytotoxic T-lymphocytes, characterized by a content of a synthetic vaccine according to one or several of the claims 1-7, if necessary aside from the usual auxiliary and/or carrier substances and, if necessary, aside from other vaccines.

10. Process for immunizing humans and mammals, characterized in that a vaccine according to one or several of the claims 1-7 or a

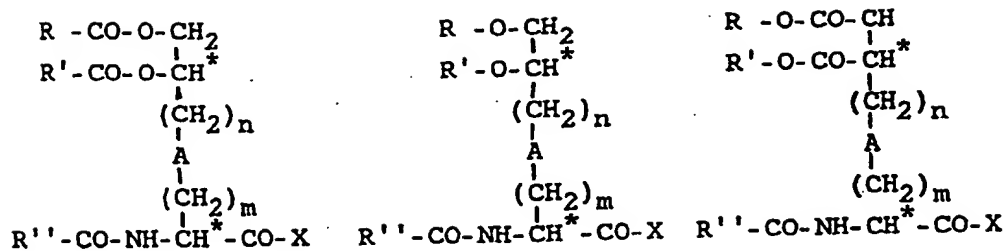
pharmaceutical or veterinary medicinal preparation is administered according to claim 9.

Patent claims for the following countries: ES, GR:

1. Process for producing a synthetic vaccine for the specific induction of cytotoxic T-lymphocytes, which consists of a conjugate of at least one membrane anchoring compound and a protein containing at least one protein of a virus, a bacteria, a parasite, or a tumor antigen containing at least one killer T-cell epitope, or at least one partial sequence of a virus, bacteria, or parasite protein containing at least one killer T-cell epitope, or a tumor antigen, characterized in that a membrane anchoring active ingredient conjugate is synthesized according to known methods.
2. Process according to claim 1, characterized in that the membrane anchoring compound is a bacterial membrane lipoprotein.
3. Process according to claim 1, characterized in that the membrane anchoring compound

/10

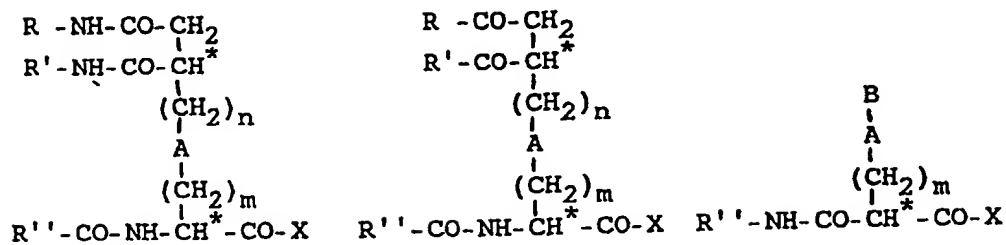
has one of the following formulas:



I.

II.

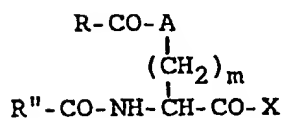
III.



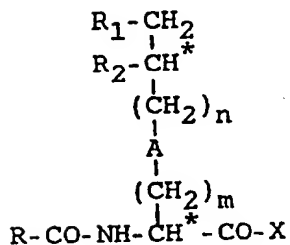
IV.

V.

VI.



VII.



VIII.



IX.

wherein A can be sulphur, oxygen, disulfide (-S-S-), methylene (-CH₂-), or -NH-;

n = 0 to 5, m = 1 or 2;

C* is an asymmetric carbon atom with R or S configuration;
R, R', and R'' are identical or different, and are hydrogen or
alkyl, alkenyl, or alkynyl groups with 7 to 25 carbon atoms,
which can be substituted with hydroxy, amino, oxo, acyl, alkyl,
or cycloalkyl groups; E can be, in the formula IX, hydrogen or
any desired secondary chain of a natural or artificial α -amino
acid; B can have in the formula VI the meaning of each of the
(CH₂)_n-(substituted alkyl) residues listed in the formulas I-V;
and R₁ and R₂ are identical or different and have the same
meaning as R, R', and R'', but can also be OR, O-COR, COOR,
NHCOOR, or CONHR, wherein X is a chain of up to 10 amino acids on
which the protein or the partial sequence of the virus, bacteria,
or parasite protein or a tumor antigen is bonded, or is the
protein or the partial sequence itself.

4. Process according to claim 1, characterized in that the
membrane anchoring compound is N-palmitoyl-S-2,3-
(bispalmitoyloxy)-propyl-cysteiny-l-seryl-serin, wherein the
partial sequence is bonded to the terminal serin residue.

5. Process according to claim 1, characterized in that the
protein or the partial sequence originate from the adenovirus,
HIV, influenza virus, LCMV, MCMV, hepatitis virus, HTLV, FELV,
Treponema pallidum,

/11

gonococcus, Bordella pertussis, or plasmodium spec. or another pathogen containing a killer T-cell epitope.

6. Process according to claim 1, characterized in that a mixture of membrane anchoring active ingredient conjugates with different partial sequences is produced.

7. Process according to claim 1, characterized in that a vaccine is produced, in which, aside from the membrane anchoring active ingredient conjugates for the induction of cytotoxic T-lymphocytes, also membrane anchoring active ingredient conjugates for producing neutralizing antibodies are present.

/12

Keys to Fig. 1: (1) IN-VIVO IMMUNIZATION WITH; (2) PEPTIDE; (3) Pam₃Cys-Ser-Ser-Peptide; (4) IN VITRO STIMULATION WITH PEPTIDE; (5) VIRUS TARGET CELL; (6) INFECTED; (7) CONTROL; (8) EFFECTOR:TARGET CELL RATIO; (9) % OF SPECIFIC RELEASE; (10) PEPTIDE CONCENTRATION; (11) IN VITRO STIMULATION WITH PEPTIDE; (12) PEPTIDE TARGET CELL; (13) IN VITRO STIMULATION WITH VIRUS; (14) VIRUS TARGET CEL; (15) INFECTED; (16) CONTROL; (17) EFFECTOR:TARGET CELL RATIO.

/13

Keys to Fig. 2: (1) IMMUNIZATION WITH VIRUS; (2) IMMUNIZATION WITH; (3) % OF SPECIFIC RELEASE; (4) IMMUNIZATION WITH VIRUS; (5) IMMUNIZATION WITH; (6) TARGET CELLS; (7) INFECTED; (8) INFECTED; (9) EFFECTOR:TARGET CELLS RATIO.

Keys to Fig. 3: (1) IMMUNIZATION WITH; (2) IMMUNIZATION WITH; (3) IMMUNIZATION WITH; (4) % OF SPECIFIC RELEASE; (5) IMMUNIZATION WITH VIRUS; (6) IMMUNIZATION WITH; (7) IMMUNIZATION WITH; (8) IN VITRO SIMULATION WITH NP 147-158.R-; (9) TARGET CELLS; (10) IMMUNIZATION WITH VIRUS; (11) IMMUNIZATION WITH; (12) IMMUNIZATION WITH; (13) IN VITRO STIMULATION WITH NP 365-380; (14) EFFECTOR:TARGET CELL RATIO.

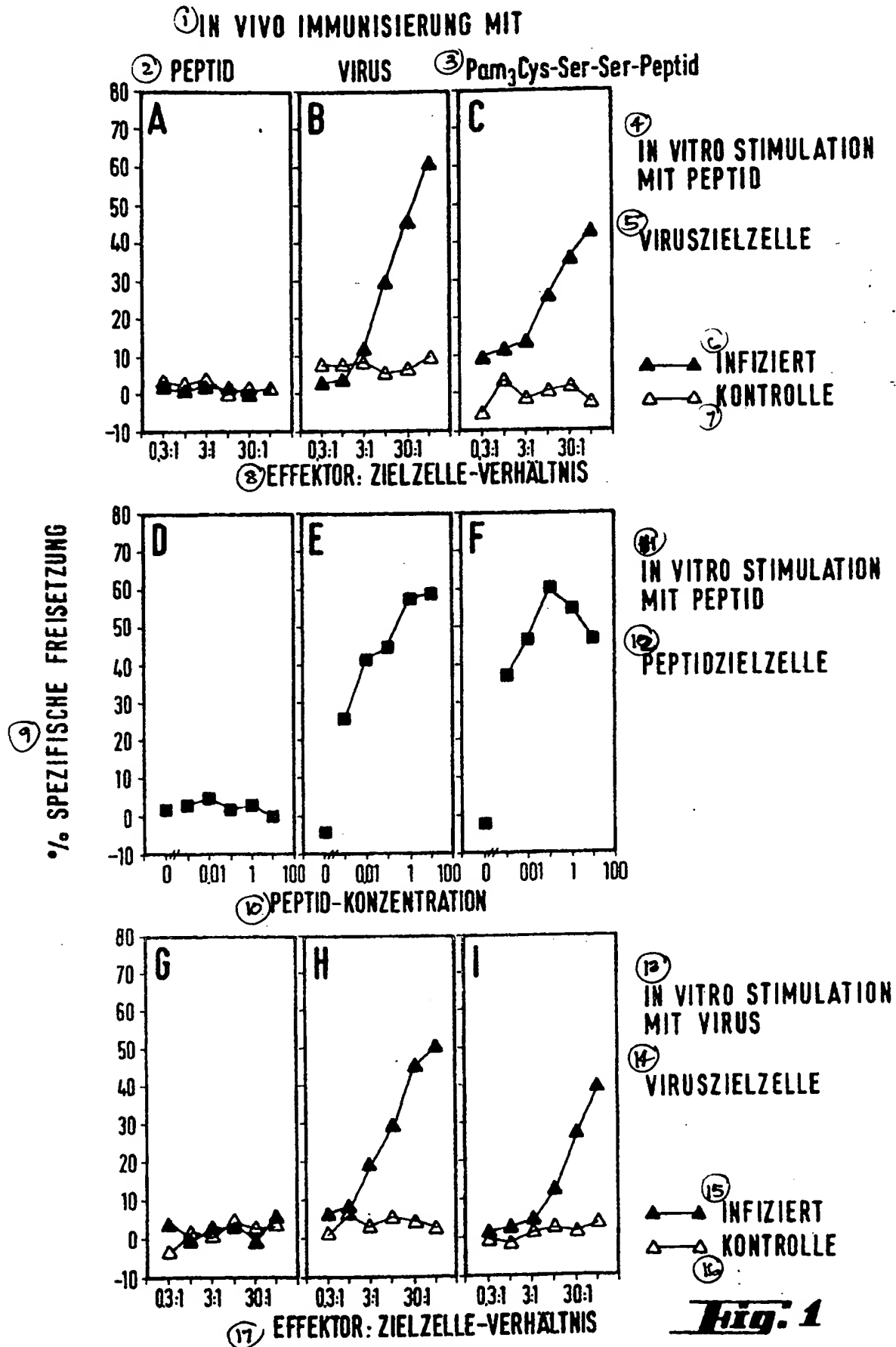


Fig. 1

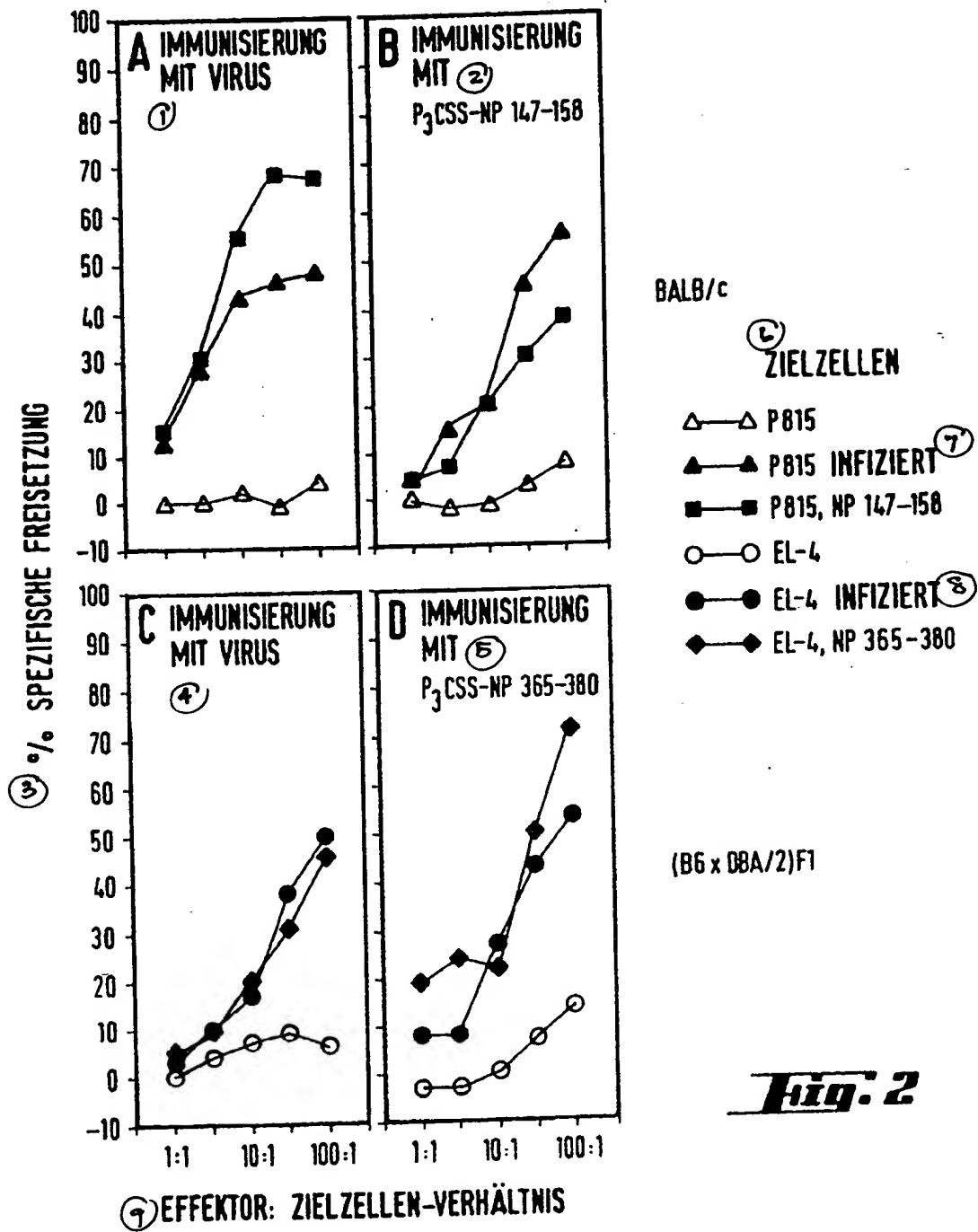


Fig. 2

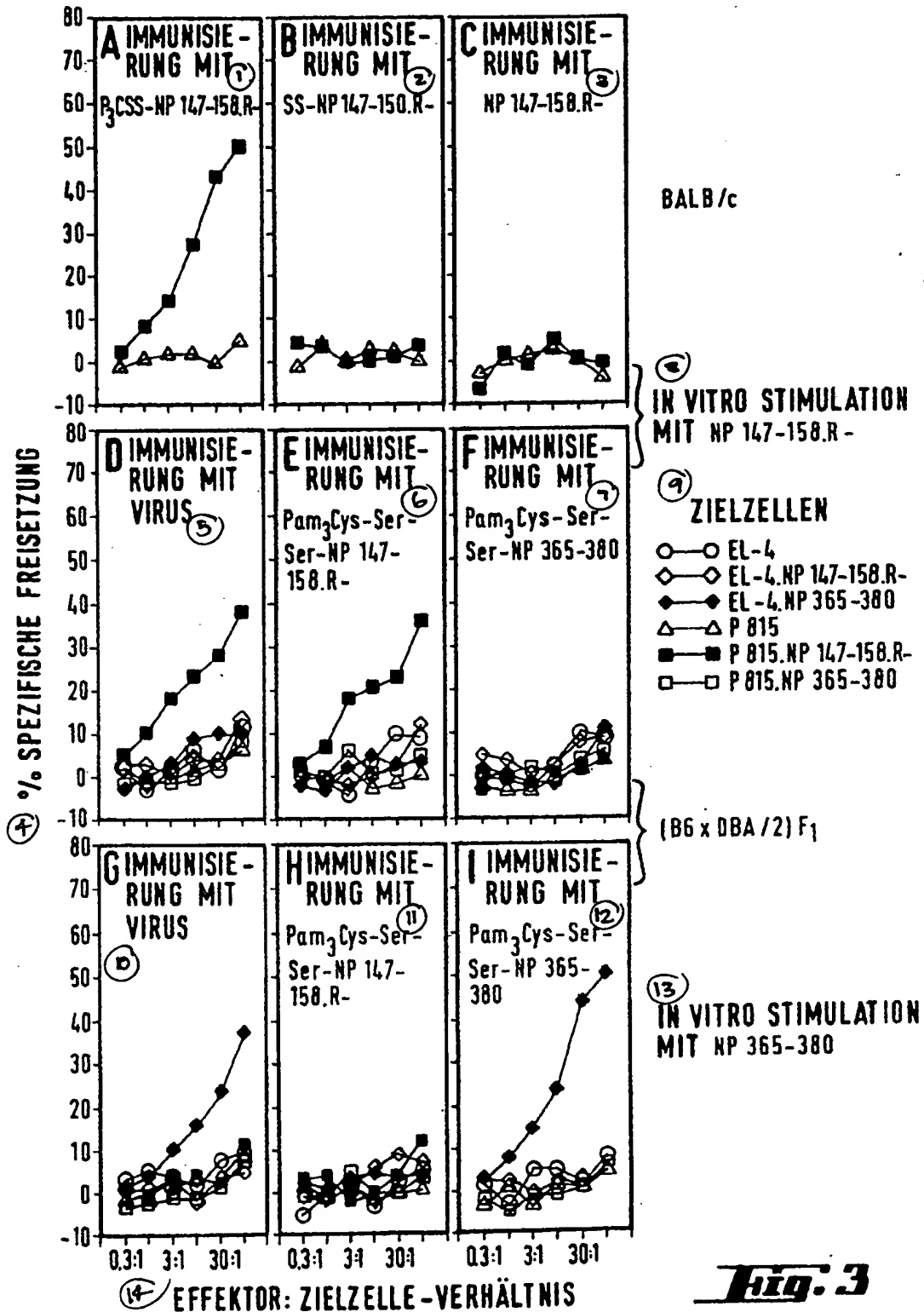


Fig. 3